
ÉCOLE CENTRALE DE LYON**THÈSE**

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : « Ingénierie pour le vivant »

préparée dans le **Laboratoire Ampère**dans le cadre de l'Ecole Doctorale « **Électronique, Électrotechnique et Automatique** »

par

Jérémy Pivetal

Développement et premières applications d'une méthode de tri de cellules bactériennes par marquage de l'ADN avec des nanoparticules magnétiques pour l'étude de la diversité bactérienne environnementale et des transferts horizontaux de gènes *in situ*.

JURY

Président	Pierre Peyret	Professeur – Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand
Rapporteur	Thierry Heulin	Directeur de Recherche CNRS – institut de biologie environnementale et biotechnologie, Cadarache
Rapporteur	Marie-Caroline Jullien	Chargée de Recherche CNRS – Ecole supérieur de physique et de chimie industrielles de la ville de Paris
Examineur	Nora Dempsey	Chargée de Recherche CNRS – Institut Néel, Grenoble
Examineur	Philippe Garrigues	Directeur de Recherche CNRS – Institut des Sciences Moléculaires, Bordeaux
Encadrant	Marie Frénéa-Robin	Maître de Conférences – Université Claude Bernard Lyon 1, laboratoire Ampère
Encadrant	Naoufel Haddour	Maître de Conférences – Ecole Centrale de Lyon
Directeur de thèse	Pascal Simonet	Directeur de Recherche CNRS, Ecole Centrale de Lyon

TITRE : DEVELOPPEMENT ET PREMIERES APPLICATIONS D'UNE METHODE DE TRI DE CELLULES BACTERIENNES PAR MARQUAGE DE L'ADN AVEC DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES POUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE ENVIRONNEMENTALE ET DES TRANSFERTS HORIZONTALS DE GENES IN SITU.

Résumé : En dépit de leur importance, la caractérisation des communautés bactériennes dans l'environnement reste encore très incomplète. Les principales raisons sont, d'une part, la difficulté d'appréhender la totalité de la communauté bactérienne quand plus de 99% des bactéries demeurent récalcitrantes à la culture *in vitro* et ne peuvent donc être étudiées par les approches classiques de microbiologie. D'autre part, la métagénomique, censée contourner cette méthode de culture en s'intéressant à l'ensemble des génomes extraits des milieux d'études, demeure elle aussi imparfaite du fait de limitations techniques (biais d'extraction de l'ADN, de clonage, de PCR, de séquençage et d'assemblage des génomes etc.) et conceptuelles, inhérentes à la complexité et l'hétérogénéité des environnements. Pour compenser les limites de chacune de ces techniques, des méthodes de tri cellulaire appliquées en conjonction avec les deux premières pourraient aider à un meilleur décryptage de la diversité microbienne. Basée sur la sélection spécifique (taxonomique et/ou fonctionnelle) et l'isolement direct des cellules bactériennes ciblées à partir d'un échantillon environnemental complexe, l'étude est restreinte à une population spécifique, voire à une cellule isolée. Pourront alors être appliquées les approches classiques de mise en culture ou d'extraction de l'ADN pour une étude restreinte à l'ADN ou l'ARN, leur répétition sur les différentes populations devant à terme (lointain) approcher l'exhaustivité. C'est dans ce contexte que s'est positionné ce travail de thèse visant dans un premier temps à mettre au point un nouvel outil de tri cellulaire basé sur l'intégration de micro-aimants permanents dans un canal microfluidique. A partir de ce système de tri magnétique miniaturisé, offrant de nombreux avantages (dispositif portable, peu coûteux, nécessitant de faibles volumes réactionnels et potentiellement intégrable en « laboratoire sur puce »), une technique d'isolement sélectif de cellules bactériennes marquées magnétiquement a alors été développée. Ciblées sur des critères taxonomiques après hybridation *in situ* avec des sondes d'acides nucléiques biotinylés complémentaires d'une région spécifique du gène 23S rRNA, des cellules bactériennes ont été marquées magnétiquement après réaction de la sonde avec des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées par des molécules de streptavidine. Les premiers résultats montrent l'établissement d'une méthode de tri suffisamment spécifique et sensible pour piéger les cellules marquées diluées (0,04%) au sein d'une suspension, à des niveaux compatibles avec l'isolement futur de populations d'intérêt à partir de communautés d'environnements complexes. Sur un principe comparable, l'approche a été adaptée à l'étude des transferts horizontaux de gènes *in situ*. Les applications d'un tri cellulaire grâce au marquage par des nanoparticules magnétiques et l'emploi de micro-aimants intégrés dans des microsystèmes fluidiques semblent donc très prometteuses pour le développement de la microbiologie environnementale.

Mots clés : tri cellulaire magnétique ; microsystème ; hybridation magnétique *in situ* ; nanoparticules magnétiques ; transfert horizontal de gènes, génomique sur cellules isolées.

TITLE: DEVELOPMENT AND FIRST APPLICATIONS OF A BACTERIAL CELL SORTING METHOD BY LABELING DNA WITH MAGNETIC NANOPARTICLES TO STUDY BACTERIAL DIVERSITY AND IN SITU HORIZONTAL GENE TRANSFER.

Summary : Despite their importance, bacterial communities in the environment remain poorly characterized. On the one hand, it is difficult to gain knowledge of the community as a whole because over 99% of bacteria are recalcitrant to *in vitro* culture, rendering classic microbiological approaches impossible to carry out. On the other hand, metagenomics, which can be used to circumvent culture-based approaches by extracting all the genomes from a given environment, is also problematic given the associated technical limitations (biases related to DNA extraction, cloning, PCR, genome sequencing and assembling etc.), and conceptual difficulties related to the complexity and the homogeneity of the environments. In order to overcome some of the limitations of these approaches, bacterial cell selection methods have been developed and can be used to improve our understanding of microbial diversity. Based on taxonomic and/or functional selection and the direct isolation of bacterial cells from an environmental sample, bacterial cell selection can be used to reduce microbial community complexity by targeting specific populations, or even an isolated cell. A variety of classic approaches such as cultivation or DNA/RNA extraction can then be carried out. This cycle can theoretically be repeated until all members of the community are characterized. The aim of this doctoral thesis was to design a novel cell selection tool based on the permanent integration of micro-magnets into a microfluidic canal. In conjunction with a new miniaturized magnetic selection system that provides several advantages over larger systems (portable, low cost, requiring smaller reaction volumes and can be potentially integrated on "laboratory on a chip" systems), a method for selective bacterial cell isolation using magnetic labeling was developed. The bacterial cells were targeted based on taxonomic criteria; biotin-labeled probes were developed for a specific region of the 23S rRNA gene. Following *in situ* hybridization with the probes, bacterial cells were labeled with streptavidin-functionalized magnetic nanoparticles. First results showed that the tool was specific and sensitive enough to trap labeled and diluted (0,04%) cells from a suspension at levels that are comparable to populations of interest found in complex environmental communities. This tool has also been adapted to study *in situ* horizontal gene transfer as well. The application of a cellular selection tool that labels targets with magnetic nanoparticles coupled to fluidic microsystems with integrated nano-magnets looks very promising for future studies in environmental microbiology.

Key words: magnetic cell sorting ; microsystems ; magnetic *in situ* hybridization ; magnetic nanoparticles ; horizontal gene transfer, single cell genomics.

Remerciements

Avant tout, je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mes directeurs/co-directeurs de thèse, Pascal Simonet, Marie Frénéa-Robin et Naoufel Haddour. Pascal, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir offert la chance de pouvoir réaliser cette thèse. Merci pour tes conseils, pour ton soutien et l'attachement que tu as eu pour le travail que j'ai effectué. Marie, merci pour ta gentillesse, ta patience, et surtout de ton investissement envers moi durant ces trois années (et demi...) au même titre que Naoufel avec qui j'ai vraiment eu la chance de travailler. C'est vrai que mes « oui mais non... » et ma positivité étaient peut être un peu compliqués à gérer mais finalement on s'est toujours bien entendus, non ☺? Merci à vous trois, vraiment...

Pour ce qui est de l'accomplissement de cette thèse, je remercie toutes les personnes qui ont été impliquées dans ce projet : Nora Dempsey, Frederic Dumas-Bouchiat, Gilbert Reyne, Luiz Fernando Zanini et Georgeta Ciuta. Merci à la région Rhône-Alpes d'avoir financé ce projet et merci aux membres du jury qui ont bien voulu me consacrer une partie de leur temps : Thierry Heulin, Marie-Caroline Jullien, Pierre Peyret, Philippe Garrigues et encore une fois Nora Dempsey.

Je souhaite également remercier Timothy Vogel et Delina Lyon avec qui tout a (finalement) commencé. Tim I'd like to thank you for giving me the opportunity to join the lab but more importantly I'd like to thank you for your kindness and all the discussion scientific and otherwise. Big thanks Tim... Del, it was a real pleasure learning from you, you taught me that you can do good science and still have fun.

J'en profite aussi dans la liste des «avec qui tout a (finalement) commencé » pour remercier Sébastien Cecillon qui, je le sais, m'a toujours appuyé. Merci Seb !

A présent, je remercie les personnes de mon bureau, avec lesquelles j'ai passé ces trois ans (et demi...) et avec qui j'ai noué des liens professionnels et amicaux. Je commencerais par Josph Nesme, parce que quand on Nesme on compte pas, Eliana Rondon-Pinilla-Davoine qui arrivera bien à faire marcher ses simoulacion un jour, Amal El-Gaddar pour son esprit content tout le temps et Alban Mathieu avec qui - du master, au stage avec Nathalie Lombard (ah oui merci Nat!) jusqu'à la thèse que lui a préféré faire deux fois – j'ai passé vraiment beaucoup de temps. C'était bien cool Alban.

Un merci à tant d'autres personnes : Samuel Jacquiod avec ses bin dis donc..., Laurine Blanchard avec ces chocs multi chocs ! sans oublier bien sure Marvic Rico, Lorrie Maccario, Sandrine Demanèche, Laure Franqueville, D'Js (Alias Jean-Sébastien Beaunes), Jérémy Reboulet, Isabelle Navaro, Laura Sanguino. Mes chers collègues de microsystèmes : Osman Osman, Samia Menad, Sylvain Toru. Mais encore, Riccardo Scorretti, François Buret, Sylvia Ribot, Marie-Christine Havgoudoukian, Fatima El-Boukhrissi, Richard ébénistes biologiste et Jacques...Je remercie également et particulièrement Alice qui, quelque part entre deux congés bonifiés, était toujours là pour nous.

Il y a aussi quelques anciens que je voudrais remercier : Cedric Malandain, Yoann-Nicolas Jaffres, (parlons-en de ces deux là...) Céline Baguelin, Jean-Michel Monier, Sandra Entresangles, Frederic Lehembre, Emmanuelle Prestat, Tom Delmont, Monique Lacroix, Barbara Pivato, Marina Hery, Aurélie Faugier, Maude David....

Et je terminerais en remerciant chaleureusement Catherine Larose (Kat, get a coffee on!) parce que je tiens à terminer en remerciant chaleureusement Catherine Larose.

Quelques proches maintenant : Guix, Marix, Aurelix, Tof-tof, Rom-rom, Yann, Malox, Ben Pak, Greg et Mary. Un peu plus proche, Sara, que je réentends : « tu vas faire une thèse ! tu vas pas partir je sais pas où, je sais pas combien de temps et je sais pas faire quoi ! » et finalement ma famille (très proche) en commençant par mes grands parents qui auraient été très fiers de moi. Père. Mèl, Nana et gros Titi (mes sœurs et mon frère dans l'ordre décroissant). Mère... un grand merci parce que tout ça, c'est grâce à toi (je sais ce que tu vas dire de toute façon : « ouais contente mais peut mieux faire... » Et finalement, courageux Vévette qui s'est occupé de moi, un super merci parce que sans toi, je n'aurai sûrement pas pu dire merci maintenant.

Résumé

En dépit de leur importance, la caractérisation des communautés bactériennes dans l'environnement reste encore très incomplète. Les principales raisons sont, d'une part, la difficulté d'appréhender la totalité de la communauté bactérienne quand plus de 99 % des bactéries demeurent récalcitrantes à la culture *in vitro* et ne peuvent donc être étudiées par les approches classiques de microbiologie. D'autre part, la métagénomique, censée contourner cette méthode de culture en s'intéressant à l'ensemble des génomes extraits des milieux d'études, demeure elle aussi imparfaite du fait de limitations techniques (biais d'extraction de l'ADN, de clonage, de PCR, de séquençage et d'assemblage des génomes etc.) et conceptuelles, inhérentes à la complexité et l'hétérogénéité des environnements. Pour compenser les limites de chacune de ces techniques, des méthodes de tri cellulaire appliquées en conjonction avec les deux premières pourraient aider à un meilleur décryptage de la diversité microbienne. Basée sur la sélection spécifique (taxonomique et/ou fonctionnelle) et l'isolement direct des cellules bactériennes ciblées à partir d'un échantillon environnemental complexe, l'étude est restreinte à une population spécifique, voire à une cellule isolée. Pourront alors être appliquées les approches classiques de mise en culture ou d'extraction de l'ADN pour une étude restreinte à l'ADN ou l'ARN, leur répétition sur les différentes populations devant à terme (lointain) approcher l'exhaustivité.

C'est dans ce contexte que s'est positionné ce travail de thèse visant dans un premier temps à mettre au point un nouvel outil de tri cellulaire basé sur l'intégration de micro-aimants permanents dans un canal microfluidique. A partir de ce système de tri magnétique miniaturisé, offrant de nombreux avantages (dispositif portable, peu coûteux, nécessitant de faibles volumes réactionnels et potentiellement intégrable en « laboratoire sur puce »), une technique d'isolement sélectif de cellules bactériennes marquées magnétiquement a alors été développée. Ciblées sur des critères taxonomiques après hybridation *in situ* avec des sondes - des cellules bactériennes ont été marquées magnétiquement après réaction de la sonde avec des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées par des molécules de streptavidine. Les premiers résultats montrent l'établissement d'une méthode de tri suffisamment spécifique et sensible pour piéger les cellules marquées diluées (0,04 %) au sein d'une suspension, à des niveaux compatibles avec l'isolement futur de populations d'intérêt à partir de communautés d'environnements complexes. Sur un principe comparable, l'approche a été adaptée à l'étude des transferts horizontaux de gènes *in situ*. Les applications d'un tri cellulaire grâce au marquage par des nanoparticules magnétiques et l'emploi de micro-aimants intégrés dans des microsystèmes fluidiques semblent donc très prometteuses pour le développement de la microbiologie environnementale.

Sommaire

-Glossaire et abréviations-	- 13 -
-Listes des figures-	- 14 -
-Préambule-	- 19 -
INTRODUCTION GENERALE	- 21 -
I) LES BACTERIES	- 21 -
I-1. Description générale	- 21 -
I-2. Rôles et importance des bactéries pour l'homme et son environnement	- 22 -
I-3. Capacité d'adaptation des bactéries	- 23 -
II) TECHNIQUES D'ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE	- 23 -
II-1. Approche traditionnelle : la culture in vitro	- 24 -
II-1-1. Définition	- 24 -
II-1-2. Apports et limites de la culture in vitro	- 24 -
II-2. Approches indépendantes de la culture	- 25 -
II-2-1. La génomique bactérienne	- 25 -
II-2-2. La génomique bactérienne environnementale : la métagénomique	- 26 -
II-2-3. Apports et limites de la métagénomique	- 28 -
III) INTRODUCTION AU SUJET DE THESE	- 29 -
 CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
<i>TECHNIQUES DE TRI CELLULAIRE POUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE</i>	- 33 -
INTRODUCTION	- 35 -
I) LE TRI CELLULAIRE - GENERALITES-	- 36 -
II) MARQUAGE SPECIFIQUE DES CELLULES BACTERIENNES	- 37 -
II-1. Marquage antigénique : l'immunomarquage	- 37 -
II-2. Ciblage génétique : l'hybridation in situ	- 40 -
II-2-1. Cible de l'hybridation in situ	- 42 -
II-2-1-1. Ciblage taxonomique par hybridation in situ	- 42 -

II-2-1-2. Ciblage fonctionnel par hybridation in situ.....	- 43 -
II-2-2. Définition des sondes.....	- 45 -
II-2-3. Marquage fluorescent par hybridation fluorescente in situ.....	- 46 -
II-2-3-1. Les sondes mono-marquées.....	- 46 -
II-2-3-2. Amplification du signal fluorescent.....	- 46 -
II-2-4. Marquage magnétique par hybridation magnétique in situ.....	- 50 -
II-2-4-1. Concept de « probe-based cell fishing ».....	- 50 -
II-2-4-2. Le magnéto-FISH.....	- 50 -
II-3. Les protéines fluorescentes.....	- 52 -
III) APPROCHES DE SELECTION DES CELLULES BACTERIENNES MARQUEES.....	- 53 -
III-1. Les trieurs conventionnels de cellules.....	- 53 -
III-1-1. Les trieurs conventionnels de cellules fluorescentes (FACS®).....	- 53 -
III-1-1-1. Principe du FACS®.....	- 53 -
III-1-1-2. Apports et limites du FACS®.....	- 55 -
III-1-2. Le tri magnétique de cellules.....	- 56 -
III-1-2-1. Propriétés magnétiques des matériaux.....	- 56 -
III-1-2-2. La Force magnétique.....	- 60 -
III-1-2-3. Cas d'une particule immergée dans un liquide.....	- 62 -
III-1-2-4. Les particules magnétiques.....	- 64 -
III-1-3. Procédures de séparation magnétique conventionnelles.....	- 68 -
III-1-3-1. Les macro-aimants.....	- 68 -
III-1-3-2. Le système MACS® :.....	- 68 -
III-1-3-3. Apports et limites de la séparation magnétique conventionnelle.....	- 70 -
III-2. Systèmes de tri miniaturisés.....	- 70 -
III-2-1. Micro-trieurs de cellules fluorescentes : les micro-FACS.....	- 71 -
III-2-2. Les micro-trieurs de cellules magnétiques.....	- 73 -
III-2-1. Intégration de sources de champ magnétique en microfluidique.....	- 73 -
III-2-1-1. Les micro-électroaimants intégrés.....	- 74 -
III-2-1-2. Les matériaux ferromagnétiques micro-structurés.....	- 74 -
III-2-1-3. Les micro-aimants permanents.....	- 76 -
III-1. Séparation magnétique en système microfluidique.....	- 76 -
CONCLUSIONS.....	- 80 -

CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT D'UN MICROSYSTEME DE TRI MAGNETIQUE : INTEGRATION D'UN RESEAU DE MICRO-AIMANTS PERMANENTS DANS UN CANAL MICROFLUIDIQUE.....	- 83 -
INTRODUCTION.....	- 85 -
I) LES MICRO-AIMANTS.....	- 86 -
I-1. Concept et fabrication.....	- 86 -
I-2. Géométrie des micro-aimants.....	- 86 -
I-3. Observation des micro-aimants.....	- 88 -
II) CARACTERISTIQUES MAGNETIQUES DES MICRO-AIMANTS	- 88 -
II-1. Densité de flux magnétique.....	- 88 -
II-2. Gradients de champ magnétique	- 88 -
II-3. Capacité d'attraction des micro-aimants	- 90 -
II-3-1. Attraction de nanoparticules magnétiques.....	- 90 -
II-3-2. Attraction de liposomes marqués magnétiquement sur réseau de micro-aimants	- 92 -
II-3-3. Attraction de bactéries marquées magnétiquement sur un réseau de micro-aimants.	- 94 -
III) INTEGRATION DES MICRO-AIMANTS DANS UN DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE.....	- 96 -
III-1. Réalisation du dispositif microfluidique de tri magnétique.....	- 96 -
III-1-1. Fabrication du microcanal	- 96 -
III-1-2. Revêtement du réseau de micro-aimants par une fine couche de PDMS	- 98 -
III-2. Influence de l'épaisseur de la couche de PDMS sur l'attraction magnétique....	- 100 -
IV) CAPACITE DE TRI DU DISPOSITIF.....	- 102 -
CONCLUSIONS	- 104 -

**CHAPITRE III : APPLICATION A L'ISOLEMENT SPECIFIQUE D'UNE POPULATION BACTERIENNE
MARQUEE MAGNETIQUEMENT APRES HYBRIDATION IN SITU..... - 107 -**

INTRODUCTION..... - 109 -

I) MATERIELS ET METHODES..... - 110 -

I-1. Souches bactériennes et conditions de culture - 110 -

I-2. Préparation des sondes..... - 110 -

I-2-1. Extraction et purification des acides nucléiques d'Escherichia coli DH10 β
..... - 110 -

I-2-2. Amplification PCR de la région hypervariable du domaine III
de l'ADNr 23S d'Escherichia coli DH10 β - 110 -

I-2-3. Transcription in vitro des fragments d'ADNr 23S amplifiés..... - 110 -

I-2-4. Biotinylation des transcrits d'ADN - 111 -

I-3. Hybridation in situ - 111 -

I-3-1. Fixation des cellules bactériennes..... - 111 -

I-3-2. Optimisation des conditions d'hybridation..... - 111 -

I-4. Marquage des cellules hybridées avec des nanoparticules magnétiques..... - 112 -

I-5. Construction du système microfluidique - 112 -

I-6. Tri d'un mélange de cellules bactériennes marquées et non marquées..... - 112 -

I-7. Identification et quantification de cellules bactériennes dans les différentes
fractions de tri par PCR quantitative (qPCR)..... - 113 -

II) RESULTATS..... - 113 -

II-1. Marquage des cellules bactériennes..... - 113 -

II-1-1. Cible du marquage - 113 -

II-1-2. Préparation des sondes - 114 -

II-2. Hybridation in situ - 116 -

II-2-1. Optimisation des conditions d'hybridation..... - 116 -

II-2-2. Marquage des cellules hybridées avec des nanoparticules magnétiques - 118 -

II-3. Micromanipulation des cellules bactériennes marquées magnétiquement - 118 -

II-3-1. Expérience de tri cellulaire..... - 118 -

II-3-2. Identification et quantification des bactéries dans les différentes fractions de tri
..... - 120 -

III) DISCUSSION	- 122 -
III-1. Marquage magnétique des cellules bactériennes.....	- 122 -
III-1-1. Concept de « magnetic probe based cell fishing »	- 122 -
III-2. Site cible et spécificité des sondes polyribonucléotidiques.....	- 123 -
III-3. Tri des cellules bactériennes marquées magnétiquement.....	- 124 -
III-4. Performances du système de tri	- 124 -
III-4-1. Taux de récupération	- 124 -
III-4-2. Pureté	- 124 -
III-4-3. Débit de tri	- 125 -
III-1. Justification du potentiel d'application du système	- 126 -

CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE MARQUAGE DE L'ADN PAR DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES POUR ETUDIER LES TRANSFERTS HORIZONTALS DE GENES CHEZ LES BACTERIES	- 129 -
--	---------

INTRODUCTION	- 131 -
---------------------------	---------

I) MATERIELS ET METHODES	- 134 -
I-1. Matériels de travail	- 134 -
I-1-1. Nanoparticules magnétiques	- 134 -
I-1-2. Souches bactériennes.....	- 134 -
I-1-3. Plasmides utilisés et méthodes de préparation.	- 134 -
I-1-4. Les micro-aimants.....	- 135 -
I-2. Interaction nanoparticules/bactéries	- 135 -
I-2-1. Adsorption des nanoparticules sur les bactéries.....	- 135 -
I-2-2. Toxicité des nanoparticules.....	- 135 -
I-3. Marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques	- 136 -
I-3-1. Marquage total	- 136 -
I-3-1-1. Fonctionnalisation des plasmides.....	- 136 -
I-3-1-2. Couplage plasmides-nanoparticules	- 136 -
I-3-2. Marquage localisé	- 137 -
I-3-2-1. Amplification d'un fragment de gène.....	- 137 -
I-3-2-2. Clonage du fragment LacZ fonctionnalisé dans les plasmides	- 138 -

I-3-2-3. Marquage plasmides-nanoparticules	- 139 -
I-4. Caractérisation des conjugués plasmides-nanoparticules	- 139 -
I-4-1. Migration sur gel d'agarose	- 139 -
I-4-2. Microscopie à force atomique (AFM).....	- 139 -
I-5. Purification des ADN marqués.....	- 139 -
I-5-1. Par centrifugation sur filtre.....	- 140 -
I-5-2. Par chromatographie d'exclusion.....	- 140 -
I-5-3. Par extraction sur gel d'agarose.....	- 140 -
I-5-4. Par purification sur colonne de silice	- 140 -
I-6. Etude de l'accessibilité enzymatique des conjugués plasmides-nanoparticules .	- 141 -
I-7. Internalisation des plasmides marqués dans les bactéries	- 141 -
I-7-1. Electroporation.....	- 141 -
I-8. Attraction des bactéries transformées sur un réseau de micro-aimants.....	- 142 -
II) RESULTATS.....	- 142 -
II-1. Adsorption des nanoparticules sur les bactéries.....	- 142 -
II-1. Toxicité potentielle des nanoparticules.....	- 146 -
II-2. Marquage des plasmides par des nanoparticules magnétiques	- 146 -
II-2-1. Marquage total des plasmides.....	- 148 -
II-2-1-1. Couplage plasmides - nanoparticules par liaison amide.....	- 148 -
II-2-1-2. Caractérisation du marquage par liaison amide	- 148 -
II-2-1-3. Couplage plasmides-nanoparticules par liaison biotine-streptavidine. -	150 -
II-2-1-4. Caractérisation du marquage par liaison biotine-streptavidine	- 150 -
II-2-2. Marquage localisé de l'ADN.....	- 152 -
II-2-2-1. Ligation du fragment LacZ dans le plasmide pEGFP-C1.....	- 152 -
II-2-2-2. Marquage de la ligation lacZbiotine-pEGFP-C1	- 154 -
II-3. Purification des conjugués plasmides-nanoparticules	- 156 -
II-3-1. Centrifugation sur filtre	- 156 -
II-3-2. Chromatographie d'exclusion	- 158 -
II-3-3. Extraction sur gel d'agarose.....	- 158 -
II-3-1. Purification sur colonne de silice.....	- 158 -
II-1. Etude de l'accessibilité enzymatique des conjugués plasmides-nanoparticules	- 160 -
II-1. Internalisation de l'ADN marqué dans des bactéries	- 160 -

III) DISCUSSION	- 162 -
III-1. Marquage in vitro d'ADN par des nanoparticules magnétiques	- 163 -
III-1-1. Choix des nanoparticules magnétiques.....	- 163 -
III-1-2. Choix de l'ADN.....	- 164 -
III-1-3. Marquage de l'ADN.....	- 165 -
III-1-3-1. Stratégies de marquage du plasmide.....	- 165 -
III-1-3-2. Fonctionnalisation chimique et couplage ADN/nanoparticules.....	- 165 -
III-1-4. Marquage localisé.....	- 166 -
III-2. Internalisation des ADN marqués dans des bactéries.....	- 166 -
III-3. Attraction des bactéries transformées sur un réseau de micro-aimants	- 167 -
III-4. Potentiel d'application de la méthode	- 167 -

Conclusions générales	- 171 -
------------------------------------	---------

Bibliographie	- 177 -
----------------------------	---------

Protocoles ANNEXES	- 199 -
---------------------------------	---------

<i>ANNEXE I : Protocole de Fabrication des micro-aimants (Institut Néel)</i>	- 200 -
--	---------

<i>ANNEXE II : Protocole de synthèse et d'attraction de liposomes magnétiques sur réseau de micro-aimants</i>	- 200 -
---	---------

II-1. Synthèse des liposomes.....	- 200 -
-----------------------------------	---------

II-2. Attraction	- 201 -
------------------------	---------

<i>ANNEXE III : Protocole d'internalisation de nanoparticules magnétiques dans des bactéries par électroporation</i>	- 201 -
--	---------

<i>ANNEXE IV : Protocole d'intégration d'un réseau de micro-aimants dans un canal microfluidique</i>	- 202 -
--	---------

IV-1. Fabrication des microcanaux.....	- 202 -
--	---------

IV-2. Revêtement du réseau de micro-aimants par une fine couche de PDMS.....	- 202 -
--	---------

IV-3. Scellement du microcanal sur le réseau de micro-aimants recouvert de PDMS-	203 -
--	-------

<i>ANNEXE V : Réglage du flux pour les expériences de tri</i>	- 203 -
---	---------

-Glossaire et abréviations-

ADN	Acide désoxyribonucléique. Molécule double brin composée d'un enchainement de desoxyribonucléotides. Pour l'ADN, il existe quatre desoxyribonucléotides différents correspondant aux quatre bases azotées qui les composent : Adénine (A), Guanine (G), Cytosine(C), Thymine(T).
ARN	Acide ribonucléique. Molécules constituées par l'assemblage de ribonucléotides à l'issue de la transcription de l'ADN. Pour l'ARN, il existe quatre ribonucléotides différents nommés en fonction des bases azotées qui les composent : Adénine (A), Guanine (G), Cytosine(C), Uracile (U).
Ribosomes	Complexe moléculaire constitué de deux sous unités (la petite et la grande) composé d'acide ribonucléique et de protéines. Les ribosomes sont impliqués dans la synthèse des protéines.
ADNr 16S (ou gène <i>rrs</i>)	Acide désoxyribonucléique ribosomique 16S. Correspond au gène codant l'ARNr 16S.
ADNr 23S (ou gène <i>rrl</i>)	Acide désoxyribonucléique ribosomique 23S. Correspond au gène codant l'ARNr 23S ribosomique.
ARNr 16S	Acide ribonucléique ribosomique 16S. L'ARNr 16S est l'un des constituants de la petite sous unité des ribosomes
ARNr 23S	Acide ribonucléique ribosomique 23S. L'ARNr 23S est l'un des constituants de la grande sous unité des ribosomes.
ARN(m)	Acide ribonucléique messenger. Molécule qui porte l'information du code génétique utile à la synthèse des protéines.
pb/kb	Abréviations de paire de base et de kilo base. Les bases étant les bases nucléiques (ATGC) constituants de l'ADN.
PCR	« <i>Polymerase chain reaction</i> » technique d'amplification de l'ADN à l'aide d'amorces spécifiques. La PCR permet de détecter ou de produire en grande quantité un gène ou un fragment de gène.
Taxon/taxa	Groupe d'organismes vivants qui descendent d'un même ancêtre et qui ont certains caractères communs.

-Listes des figures-

Chapitre I :

Figure I-1. Principe général de l'immunomarquage	- 39 -
Figure I-2. Principe général de l'hybridation in situ (fluorescente ou magnétique)	- 41 -
Figure I-3. Représentation schématique du marquage taxonomique et fonctionnel par hybridation magnétique in situ.	- 44 -
Figure I-4. Représentation schématique des différents types de sondes mono-marquées pouvant être utilisées pour le marquage par FISH.	- 47 -
Figure I-5. Schéma de principe du (CARD)-FISH.....	- 49 -
Figure I-6. Schéma de principe du (RCA)-FISH.	- 49 -
Figure I-7. Schéma de principe de l'hybridation magnétique in situ par « probe-based cell fishing »....	- 51 -
Figure I-8. Représentation schématique de l'hybridation magnétique in situ par magnéto-FISH.	- 51 -
Figure I-9. Principe général du fonctionnement d'un FACS® (ex : FACS Vantage SE)	- 54 -
Figure I-10. Echelle de susceptibilités magnétiques volumiques (unité SI).....	- 57 -
Figure I-11. Courbes $M(H)$ pour des matériaux paramagnétiques, diamagnétiques et ferromagnétique	- 57 -
Figure I-12. Cycle d'hystérésis M en fonction de H pour une substance ferromagnétique.....	- 59 -
Figure I-13. a) Lignes de champ dans le cas d'un champ uniforme b) Concentration des lignes de champ dans un matériau ferromagnétique.....	- 61 -
Figure I-14. Représentation des lignes de champs obtenues avec deux géométries d'aimants. (a) Aimant en « U » ; (b) barreau aimanté.....	- 61 -
Figure I-15. a) Un corps diamagnétique dans l'air a tendance à être repoussé vers les faibles intensités de champ. b) Un corps paramagnétique est dirigé vers les zones de densité de flux magnétique élevée	- 63 -
Figure I-16. Schéma de la structure d'une nanoparticule	- 65 -
Figure I-17. Réduction d'échelle. a) A l'échelle de la particule, la variation spatiale du champ magnétique est peu perceptible. La force résultante est faible b) la réduction de taille de l'aimant produit un gradient de champ suffisant pour engendrer une force significative sur la particule. ...	- 67 -
Figure I-18. Séparation magnétique conventionnelle (macro-aimants)	- 69 -
Figure I-19. a) Principe général de la séparation par MACS® ; b) Photographie des colonnes MACS® contenant à l'intérieur des billes de fer.	- 69 -
Figure I-20. Représentation schématique du principe d'un micro-FACS.	- 72 -
Figure I-21. Illustration de quelques micro-électroaimants.....	- 75 -
Figure I-22. Matrice de micro-électroaimants déposés sur un substrat. Chaque conducteur de la matrice est relié à une source de courant séparée qui peut être commandée individuellement par un ordinateur.....	- 75 -

Figure I-23. (a) Image d'une bactérie magnétotactique. (b) Positionnement individuel d'une bactérie magnétotactique avec un micro- électroaimant.	- 75 -
Figure I-24. Images MEB (microscopie électronique à balayage) de matériaux ferromagnétiques micro-structurés (plots de nickel).	- 75 -
Figure I-25. Image MEB de micro-aimants permanents.	- 77 -
Figure I-26. Principe du « Free-flow magnetophoresis ».	- 77 -
Figure I-27. Principe de séparation magnétique différentielle par rail magnétique	- 79 -

Chapitre II :

Figure II- 1. Schéma du processus de « Thermo-Magnetic Patterning ».....	- 87 -
Figure II-2. Représentation schématique des masques utilisés au cours du processus de « Thermo-Magnetic Patterning ».....	- 87 -
Figure II-3. a) Photographie d'un réseau de micro-aimants plats ; b) représentation schématique du principe de la révélation magnéto-optique des domaines d'aimantations ; c) et d) images magnéto-optiques obtenues en plaçant un MOIF au dessus des réseaux de micro-aimants (respectivement 100 x 100 μm et 7,5 x 7,5 μm)	- 89 -
Figure II- 4. Norme de la densité de flux magnétique 1 μm au-dessus de la surface du film magnétique structuré.....	- 89 -
Figure II-5 (a,b et c) Attraction de nanoparticules de 50 nm de diamètre sur un réseau de micro-aimants.....	- 91 -
Figure II-6. Synthèse de liposomes encapsulant des nanoparticules magnétiques. (a) Principe de l'électroformation ; (b) Observation par microscopie optique de liposomes ; (c) représentation schématique d'un liposome.....	- 93 -
Figure II-7. Attraction de liposomes ayant internalisé des nanoparticules magnétiques sur un réseau de micro-aimants de 100 x 100 μm	- 93 -
Figure II-8. Principe de l'internalisation de nanoparticules magnétiques dans les bactéries par électroporation.	- 95 -
Figure II-9. Attraction de bactéries ayant internalisé des nanoparticules magnétiques par électroporation sur un réseau de micro-aimants de 100 x 100 μm	- 95 -
Figure II-10. Représentation schématique des étapes de fabrication du microcanal en PDMS.....	- 97 -
Figure II-11. Représentation schématique de la formation des groupements silanols sur la surface des substrats (verre, PDMS, silicium...) après traitement plasma et du collage irréversible des surfaces traitées via les liaisons covalentes Si-O-Si.....	- 99 -
Figure II-12. Epaisseur de la couche de PDMS déposée à la surface du film magnétique en fonction du ratio PDMS/heptane et de la vitesse de dépôt (mesure au profilomètre).	- 101 -
Figure II-13. Influence de l'épaisseur de la couche de PDMS recouvrant le film magnétique sur l'attraction de nanoparticules de 50nm de diamètre.....	- 103 -
Figure II-14. Image du microcanal durant la séparation.....	- 103 -

Chapitre III :

Figure III-1. Alignement de la séquence du domaine III hypervariable de l'ADNr 23S d' <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 et d' <i>Escherichia coli</i> DH10 β	- 115 -
Figure III-2. Schéma du mécanisme général de la transcription de l'ADN en ARN	- 115 -
Figure III-3. a) Transcription de l'ADNr 23S dans la bactérie ; b) Synthèse des sondes polyribonucléotidiques par transcription <i>in vitro</i>	-117-
Figure III-4. Détection fluorescente de l'hybridation <i>in situ</i> effectuée avec les sondes polyribonucléotidiques ciblant le domaine III de l'ARNr 23S d' <i>Escherichia coli</i> DH10 β	- 117 -
Figure III-5. Cellules d' <i>E. coli</i> attirées sur un réseau de micro-aimants	- 119 -
Figure III-6. Etat du canal microfluidique parcourant la surface magnétique au cours du tri cellulaire.	- 121 -
Figure III-7. Identification et quantification des bactéries dans les différentes fractions de tri	- 121 -
Figure III-8. Zoom progressif montrant les cellules d' <i>E. coli</i> piégées individuellement sur un réseau de micro-aimants comportant des motifs carrés de 7,5 \times 7,5 μ m (a, b, c, d).	- 127 -

Chapitre IV :

Figure IV-1. Mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries	- 130 -
Figure IV-2. Représentation schématique du principe d'étude des transferts horizontaux de gènes après marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques. a) Marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques. b) Principe de micromanipulation des bactéries transformées génétiquement et marquées magnétiquement	- 133 -
Figure IV-3. Interaction nanoparticules OceanTech® / Bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 μ m).	- 143 -
Figure IV-4. Interaction nanoparticules Ademtech® / Bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 μ m).	- 145 -
Figure IV-5. Interaction nanoparticules Nanocs® / Bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 μ m).	- 145 -
Figure IV-6. Interaction nanoparticules MiltenyiBiotech® / Bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 μ m).	- 145 -
Figure IV-7. Toxicité des nanoparticules (Miltenyi Biotech® streptavidine 50nm) sur la croissance d' <i>E. coli</i> DH5 α après 24h d'incubation	- 147 -
Figure IV-8. Influence de la concentration en nanoparticules (Ademtech® COOH 100 nm) sur la croissance d' <i>E. coli</i> DH5 α après 24h d'incubation.	- 147 -
Figure IV-9. Représentation schématique des différents types de marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques. a) marquage total ; b) marquage localisé.	- 147 -

Figure IV-10. Représentation schématique de la fonctionnalisation amine de l'ADN et du couplage par liaison amide avec des nanoparticules possédant des groupements acide carboxylique (-COOH)	- 149 -
Figure IV-11. Caractérisation du marquage de l'ADN (plasmide-NH ₂ /nanoparticule COOH) par migration sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration.....	- 149 -
Figure IV-12. Représentation schématique de la fonctionnalisation biotine de l'ADN et du couplage par liaison biotine-streptavidine avec des nanoparticules recouvertes de streptavidine.	- 151 -
Figure IV-13. Caractérisation du marquage ADN-biotine/nanoparticule-streptavidine sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration.	- 151 -
Figure IV-14. Caractérisation du marquage ADN-biotine/nanoparticule-streptavidine par microscopie à force atomique. En a) plasmide seul, b) plasmide marqué.	- 151 -
Figure IV- 15. Schéma général de la procédure de marquage ciblé.	- 153 -
Figure IV- 16. Caractérisation de la ligation du fragment d'ADN biotinylé dans le plasmide pEGFP-C1 par migration sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration.	- 153 -
Figure IV- 17. Caractérisation du marquage ciblé du plasmide pEGFP-C1 par migration sur gel d'agarose.....	- 155 -
Figure IV-18. Représentation schématique du principe de filtration par filtre à centrifugation ..	- 157 -
Figure IV-19. Profil de diffusion dynamique de la lumière d'un mix plasmide marqué/nanoparticules.....	- 157 -
Figure IV-20. Illustration schématique du principe de chromatographie d'exclusion.	- 159 -
Figure IV-21. Illustration schématique du principe d'extraction d'ADN sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration.....	- 159 -
Figure IV-22. Illustration schématique du principe de purification de l'ADN marqué sur colonne de silice.	- 159 -
Figure IV-23. Récupération du plasmide	- 161 -
Figure IV-24. Gel d'électrophorèses faisant référence aux expériences d'accessibilité enzymatique du plasmide	- 161 -
Figure IV-25. Attraction de bactéries transformées par électroporation par un plasmide magnétique sur réseau de microaimants.....	- 161 -

-PREAMBULE-

Le sujet de cette thèse se situe à l'interface entre les domaines de la microbiologie environnementale, du magnétisme et des microtechnologies. Ce projet a été mené dans le cadre d'une collaboration du laboratoire Ampère avec deux équipes grenobloises spécialisées dans le magnétisme, appartenant respectivement à l'institut Néel et au G2Elab. Pour adapter le contenu de cette thèse à la diversité de ses lecteurs potentiels, l'introduction générale revient sur certaines notions bien connues des microbiologistes. Le rôle et l'importance des bactéries dans notre environnement y seront notamment abordés et nous décrirons les différentes techniques actuellement disponibles pour leur étude. Ces bases étant posées, nous pourrons alors aborder le corps de la thèse qui concerne le développement d'un microsystème de tri cellulaire magnétique dédié à l'étude des bactéries environnementales.

- INTRODUCTION GENERALE -

Les organismes procaryotiques, bactéries et archées, représentent l'une des premières formes de vie apparue sur terre il y a presque 4 milliards d'années¹. Depuis, et ce grâce à une capacité d'adaptation extraordinaire, ces organismes ont évolué, développant une fabuleuse diversité génétique, métabolique et fonctionnelle qui les a conduits à pouvoir coloniser tous les types d'écosystèmes de notre planète, y compris les plus inhospitaliers. On retrouve ainsi des bactéries partout : dans les océans², la neige³, la glace^{4,5}, les déserts⁶, les plantes⁷, les animaux⁸, le corps humain^{9,10} et même dans des endroits où les conditions pourraient paraître insupportables pour les autres organismes vivants : les roches profondes¹¹, les mines acides¹², les déchets radioactifs¹³, les grands fonds marins¹⁴, les régions volcaniques^{15,16}, etc. On compte aujourd'hui plus de 10^{30} cellules bactériennes sur terre représentant, tant en termes de biomasse que de richesse spécifique, la grande majorité de la biodiversité terrestre¹⁷.

I) LES BACTERIES

I-1. *Description générale*

Une bactérie est un microorganisme, le plus souvent unicellulaire et dont la taille peut varier pour la plupart entre 0,1 et 2 μm . Les bactéries possèdent généralement une paroi enveloppant la membrane plasmique entourant le cytoplasme. Ce sont des cellules procaryotes, c'est-à-dire, ne possédant pas de noyau et leur génome, composé d'ADN, est libre dans le cytoplasme. Cet ADN comprend nécessairement le chromosome qui code l'ensemble des informations nécessaires au développement de l'organisme. Toutefois, on trouve le plus souvent, en plus du chromosome, des éléments génétiques extra-chromosomiques appelés plasmides qui sont des molécules d'ADN capables de réplication autonome et qui codent des fonctions non essentielles mais généralement avantageuses pour la survie de la cellule (résistance à des antibiotiques, pouvoir pathogène...).

Les bactéries se nourrissent à partir de substances organiques plus ou moins complexes (glucides, acides gras, cellulose, hydrocarbures, etc.) ou inorganiques (dioxyde de carbone, soufre, phosphate, nitrate...) desquelles elles tirent au cours de réactions chimiques énergétiques l'énergie nécessaire pour leur croissance : réduction du dioxyde de carbone (photosynthèse), oxydation des carbonates, réduction des nitrates, oxydation du soufre, etc. On parle de métabolismes énergétiques. Ils sont importants car, nous le verrons par la suite, ils sont en partie responsables des activités fondamentales bactériennes.

I-2. Rôles et importance des bactéries pour l'homme et son environnement

Le grand public associe souvent le terme « bactéries » aux grandes maladies dont les pandémies qui, dans le passé, ont ravagé le monde (le choléra, la peste, la syphilis, la tuberculose). Toutefois, la plupart d'entre elles jouent un rôle bénéfique et parfois même indispensable dans le fonctionnement de la vie sur terre.

Leurs fonctions métaboliques sont en effet impliquées dans des transformations environnementales majeures^{18,19}. On leur doit d'abord « l'invention » de la photosynthèse qui, dans les prémices de la vie sur terre a permis l'enrichissement de l'atmosphère en oxygène. Elles jouent également un rôle fondamental dans tous les cycles biogéochimiques des éléments de la matière comme celui du carbone, de l'azote, de l'oxygène, du soufre contribuant par exemple au recyclage de la matière organique et à la mise à disposition de l'azote de l'air sous une forme assimilable par les végétaux. Chez les animaux, comme chez les ruminants par exemple, elles sont essentielles à la digestion de la cellulose non dégradable par les seules enzymes produites par l'animal. L'homme vit en association permanente avec les bactéries qui influencent sa physiologie, sa nutrition (digestion) et son immunité²⁰.

L'homme a fait aussi largement usage des potentialités des bactéries qui aujourd'hui rentrent dans le cadre de processus industriels bien maîtrisés. Par exemple, de nombreux procédés de fermentation sont à visée alimentaire^{21,22,23} (boissons alcoolisées, choucroute, yaourts, fromages). La production d'enzymes²⁴ (lipases, protéases pour les lessives par exemple), de gaz²⁵ (méthane, hydrogène), de produits pharmaceutiques²⁶ (antibiotiques) est largement basée sur des procédés biotechnologiques faisant appel aux microorganismes. Depuis une quarantaine d'années maintenant, on sait même manipuler génétiquement les bactéries de sorte qu'elles puissent produire des substances qu'elles ne synthétisent pas normalement (production de médicaments, vaccins, d'hormones de croissance humaine, d'insuline) accroissant ainsi la sécurité de ces produits biologiques^{27,28,29}.

Les bactéries sont aussi sollicitées pour leur intérêt écologique. Le traitement des eaux usées est par exemple un processus quasi exclusivement basé sur l'action des microorganismes³⁰. Les bactéries fixatrices d'azote sont recherchées pour améliorer les rendements agricoles tout en réduisant les intrants azotés à l'origine de pollutions³¹. Des bactéries pathogènes d'insectes vont être employées pour protéger des plantes, comme la bactérie *Bacillus thuringiensis* capable de produire la protéine dite Bt, toxine nocive pour certaines espèces d'insectes³². Enfin, la capacité de certaines bactéries à dégrader une large variété de composés organiques en fait des acteurs clés dans les processus de bioremédiation. Ces traitements concernent la dégradation des hydrocarbures et même, grâce à l'étonnant pouvoir d'adaptation des bactéries, celle des composés xénobiotiques toxiques utilisés comme pesticides³³.

I-3. Capacité d'adaptation des bactéries

Du fait de son importance et de sa spécificité pour le monde des procaryotes, le pouvoir d'adaptation en tant que capacité à s'approprier de nouvelles propriétés fonctionnelles a été très étudié. C'est ainsi que différents mécanismes adaptatifs ont été répertoriés comprenant mutations spontanées³⁴ et réarrangements génomiques endogènes par mouvements de transposons et de séquences d'insertion³⁵. Mais le transfert horizontal de gènes (THG) entre cellules de même génération est considéré comme le mécanisme le plus important pour engendrer des modifications profondes du potentiel fonctionnel bactérien du fait de l'ampleur de la modification génétique qu'il est susceptible de générer³⁶. Il permet en effet aux bactéries d'acquérir de nouveaux gènes ou même des opérons complets en provenance d'autres microorganismes même phylétiquement très distincts. A l'inverse de la mutagenèse spontanée ponctuelle pour laquelle généralement un grand nombre d'événements sont requis avant de modifier significativement le génotype et le phénotype d'une cellule bactérienne, le transfert horizontal de gènes permet une diffusion rapide et étendue de nouveaux traits au sein d'une communauté bactérienne participant ainsi activement et efficacement au processus adaptatif. Grâce aux THG les bactéries ont la possibilité de répondre rapidement et efficacement à une modification soudaine et prononcée des conditions environnantes. Ce phénomène a commencé à être révélé très tôt dans les années 1950 avec l'émergence de la résistance à des antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine et animale. Aujourd'hui on reconnaît également ce processus comme étant à la base des mécanismes impliqués dans la dégradation de composés xénobiotiques polluant des sols en permettant l'émergence de gènes et de voies de dégradation innovantes. Leur compréhension s'avère donc essentielle tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué. Trois mécanismes de THG sont actuellement décrits i) le transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique (conjugaison), ii) le transfert d'ADN libre ou extracellulaire (la transformation) et iii) le transport de matériel génétique entre deux bactéries *via* des bactériophages (transduction).

II) TECHNIQUES D'ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE

Malgré leur importance, les bactéries, notamment celles des environnements terrestres et aquatiques sont restées longtemps une énigme pour les scientifiques. Même si on exploitait déjà sans le savoir leur capacité de fermentation depuis l'antiquité et que certains savants, comme Aristote, soupçonnaient l'idée d'une contagion invisible de certaines maladies, rien n'était clairement établi. Il a fallu attendre le XVIIe siècle avec le développement des premiers microscopes pour que l'existence des microorganismes soit établie et leur présence détectée. Pionnier de ces découvertes, Anton van Leeuwenhoek surprit ses contemporains en révélant grâce à son premier microscope l'existence d'un monde invisible à l'œil nu. Les scientifiques de l'époque commencent alors à s'y intéresser, émettent la théorie de la

composition cellulaire de ces microorganismes et s'interrogent surtout sur leur origine les amenant à proposer l'hypothèse de la génération spontanée de ces organismes. Ce n'est cependant que deux cents ans plus tard, à partir du moment où on a su cultiver *in vitro* les bactéries qu'on a réellement pu les étudier.

II-1. *Approche traditionnelle : la culture in vitro*

II-1-1. *Définition*

La culture *in vitro* qui repose sur l'étalement d'un échantillon environnemental sur un milieu de culture solidifié a en effet constitué un excellent moyen pour les différentes populations ou espèces de microorganismes présents dans un mélange afin de pouvoir les analyser. Chaque cellule microbienne en se développant forme une colonie (une masse compacte de cellules visibles à l'œil nu) isolée des autres. Des milliards de cellules identiques (des clones) sont ainsi générées à partir d'une cellule unique qui s'est multipliée permettant de conduire des études de physiologie, de génétique et même d'écologie (sans parler d'une exploitation industrielle) à partir de ces colonies. Différents types de milieux nutritifs ont alors été élaborés pour répondre aux exigences physiologiques de ces microorganismes soit pour en optimiser la croissance, soit pour isoler ceux qui sont plus ou moins récalcitrants à la croissance *in vitro*.

Le premier objectif est de pouvoir identifier et reconnaître les bactéries ; observées au microscope, leur forme, leur mobilité, les propriétés de leur paroi sont prises en compte. Mais ces critères sont loin d'être suffisants pour identifier de façon formelle des bactéries. Les propriétés métaboliques ont donc constitué une autre série de critères d'identification bactérienne révélés d'après la croissance des bactéries sur différents substrats indiquant ainsi leur potentiel catabolique. Plus tard, ce sont les techniques liées à l'ADN qui ont été utilisées pour apporter des précisions sur la taxonomie chez les bactéries (hybridations ADN-ADN, séquençage du gène ribosomique *rrs*) et permettre de les identifier et caractériser les communautés³⁷ (profils génétiques, puces à ADN, séquençage).

II-1-2. *Apports et limites de la culture in vitro*

La mise en culture *in vitro* des microorganismes a constitué le fondement de la science « microbiologie ». Robert Koch isole l'agent du charbon épidémique (*Bacillus anthracis*), le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) responsable de la tuberculose et la bactérie responsable du choléra (*Vibrio cholerae*). Pasteur démontre que le processus de fermentation, qui transforme les sucres en alcool, est lié à l'activité des microorganismes. En écologie microbienne on étudie le rôle des microorganismes dans l'environnement. On découvre que nombre d'entre eux sont capables de vivre dans des conditions très différentes les uns des autres. On découvre que les bactéries du sol peuvent oxyder le soufre, le fer et l'ammoniaque pour obtenir de l'énergie, et on isole des bactéries fixatrices d'azote (appelées plus tard *Rhizobium*) à partir de nodules racinaires de plantes.

Grâce à leur mise en culture, à leur développement clonal favorisé par leur taux de doublement élevé et grâce aussi à leur relative simplicité en comparaison des eucaryotes, les bactéries sont devenues des modèles d'étude très utilisés. La physiologie, la génétique microbienne ont fait l'objet d'importants travaux ciblés sur des bactéries modèles comme *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*. La plupart des pathogènes humains et même animaux ont été cultivés *in vitro* et de ce fait ont pu faire l'objet d'études conduisant à développer des médicaments efficaces.

Bien qu'elles aient permis de révéler un monde nouveau, les approches basées sur la culture souffrent de limites importantes. Elles ne concernent en effet que les bactéries qui sont dans un premier temps « extractibles » et « cultivables » c'est-à-dire physiologiquement capables de se développer sur un milieu de culture. Celles-ci ne représentent qu'un faible pourcentage (très souvent < 1%) de la flore bactérienne totale de nombreux environnements dont le sol³⁸, l'immense majorité des bactéries, « non cultivables » restant non étudiées ni exploitées industriellement.

La récalcitrance à la culture *in vitro* peut avoir plusieurs causes³⁹ : tout d'abord, les milieux de culture sont loin de simuler les conditions environnementales spécifiques qui ont prévalu à l'adaptation *in situ* et dans certains cas, des espèces bactériennes ne se développeront que dans une gamme très restreinte de conditions abiotiques. La difficulté voire l'impossibilité à reproduire *in vitro* les conditions du milieu existe aussi quand des facteurs de croissance ou des composés particuliers spécifiques sont indispensables à la croissance et vont manquer dans le milieu de culture ou bien être apportés à des concentrations inadéquates. Il faut aussi considérer que dans l'environnement, les bactéries se développent en établissant entre elles des relations synergiques obligatoires dont la reproduction *in vitro* pour un isolement clonal de chacun des membres du consortium est très compliquée. En dépit de quelques succès récents basés sur des systèmes de culture améliorés^{40,41}, la grande majorité des nombreuses tentatives visant à accroître la représentation de la biodiversité bactérienne dans les collections de souches isolées se sont soldées par des échecs.

II-2. *Approches indépendantes de la culture*

II-2-1. *La génomique bactérienne*

Suite aux limitations des approches classiques de la microbiologie, de nouvelles techniques d'étude, indépendantes de la culture, ont été développées dès le début des années 1990. Ces approches ont directement bénéficié du développement de la génétique moléculaire sur les souches bactériennes isolées qui, on l'a vu, ont été utilisées dans une optique de taxonomie et de caractérisation. L'étape suivante consistait alors à prendre en compte cette fraction non cultivable des communautés bactériennes en restreignant les travaux à l'étude de leur seul ADN sur lequel pouvait être appliquée une partie des techniques développées sur les souches isolées. La biologie moléculaire, ou tout au moins l'étude de l'ADN, a été à l'origine

de toute une panoplie de nouveaux outils permettant d'appréhender au niveau taxonomique et fonctionnel la diversité bactérienne non cultivable.

L'amplification enzymatique, le clonage génétique et le séquençage de l'ADN bactérien directement extrait d'un échantillon environnemental vont permettre au travers de ce décryptage de l'information contenue dans les acides nucléiques de révéler tout un nouveau pan du monde des microbes. Véritable révolution, l'écologie microbienne moléculaire transforme la microbiologie classique basée sur un développement clonal d'une cellule comme préalable à toute étude en une analyse limitée aux molécules d'ADN puis d'ARN sans jamais recourir à l'isolement en culture pure. C'est ainsi qu'est apparue une nouvelle discipline, la génomique bactérienne environnementale, très souvent appréhendée au niveau de la communauté bactérienne pour devenir métagénomique.

II-2-2. *La génomique bactérienne environnementale : la métagénomique*

La métagénomique est définie comme l'analyse génétique directe des génomes contenus dans un échantillon environnemental⁴². Le terme « métagénomique » a été formulé pour la première fois par Handelsman faisant alors référence à l'analyse génétique des communautés microbiennes environnementales par l'isolement direct de l'ADN génomique d'un environnement (contournant ainsi l'étape de culture) suivi du clonage de cet ADN dans des organismes hôtes cultivés⁴³. Aujourd'hui, les avancées récentes du séquençage haut débit ont étendu le concept de métagénomique qui recouvre différentes exploitations de l'ADN extrait (PCR, puces à ADN) jusqu'à l'analyse d'un métagénome entier par la détermination complète des séquences nucléotidiques qui le composent. On parle de « *whole genome sequencing* »⁴².

A partir d'un échantillon environnemental donné, l'ADN est extrait pour être directement analysé, contournant ainsi l'étape de culture. Deux approches ont été développées pour extraire l'ADN bactérien environnemental. Dans la première approche (dite directe), une lyse bactérienne *in situ* réalisée à l'aide de traitements physiques et / ou chimiques vise à libérer le plus efficacement l'ADN hors des cellules avant extraction de la matrice et purification. Dans la seconde, dite indirecte, les cellules sont d'abord extraites de la matrice (par gradient de densité) avant d'être lysées. Cette seconde approche restreint fortement la contamination par des cellules des eucaryotes (fongiques et autres micro-eucaryotes) ainsi qu'avec l'ADN extracellulaire (procaryote et eucaryote) persistant dans le sol pour des efficacités d'extraction en comparaison de l'approche directe qui varient considérablement selon les auteurs^{44,45}.

Une des premières utilisations de l'ADN extrait a eu pour but d'explorer la diversité bactérienne au sein d'une communauté d'un échantillon environnemental à partir de l'analyse des séquences ADNr 16S (gène *rrs*) amplifiées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le choix de ce gène tient à plusieurs de ses caractéristiques qui en font un marqueur de choix pour l'identification des organismes⁴⁶. Ce gène est en effet ubiquiste,

présent dans tous les organismes du fait de sa fonction essentielle liée à la synthèse des protéines.

Du fait de cette fonction contrainte, l'évolution de sa séquence nucléotidique par mutations ponctuelles est extrêmement lente ce qui lui vaut son caractère d'horloge moléculaire avec donc un niveau de similarité d'autant plus élevé que les organismes seront phylétiquement proches. De plus les modifications de séquences ne sont pas réparties de façon homogène tout au long du gène mais focalisées dans des régions variables encadrées par des régions très conservées. En sélectionnant des régions plus ou moins conservées de ces gènes comme cibles pour la caractérisation d'amorces PCR, il est possible d'aborder l'étude de la communauté taxonomique depuis une prise en compte quasi exhaustive de la diversité bactérienne (amorces « universelles » complémentaires des régions hautement conservées) jusqu'à celle de groupes taxonomiques précis (amorces spécifiques). Les produits PCR générés seront analysés grâce à une batterie de méthodes des plus simples et peu coûteuses basées sur le polymorphisme de ces gènes (longueur-séquences) à la suite d'une migration électrophorétique³⁷ différentielle jusqu'au séquençage systématique⁴⁷ avec comme approche intermédiaire l'hybridation sur des puces à ADN⁴⁸. Suivant la méthode utilisée, les résultats ne fourniront qu'une estimation du niveau de la diversité au sein de la communauté (profils) ou une information qualitative et quantitative sur la composition taxonomique de cette communauté. La même stratégie méthodologique basée sur une amplification PCR peut également être développée sur d'autres gènes avec comme objectifs le recensement tant taxonomique que fonctionnel de populations bactériennes impliquées dans une activité donnée. A titre d'exemple, la fixation biologique de l'azote a été une des fonctions les plus étudiées par cette approche, tirant profit des propriétés du gène *nifH* codant une des sous-unités de la nitrogénase qui, à l'instar du gène *rrs* présente une succession de régions conservées et variables, propice à l'amplification PCR⁴⁹.

Toutefois, une autre façon d'exploiter l'ADN métagénomique extrait consiste non plus à cibler des séquences particulières par PCR mais à considérer l'ADN extrait dans sa totalité. Deux approches peuvent alors être envisagées. En accord avec la définition originelle de la métagénomique, l'ADN environnemental est utilisé pour créer des banques d'ADN par clonage dans un vecteur et transformation d'une souche bactérienne⁵⁰. Dans la majorité des cas, l'hôte bactérien utilisé est *E. coli* du fait des génotypes disponibles, des vecteurs développés, du taux de doublement de ce microorganisme, de sa bonne résistance à la conservation et de sa facilité de manipulation d'une façon générale^{51,52}. D'autres tentatives ont été expérimentées sur des hôtes alternatifs, comme *Streptomyces sp.* quand les objectifs étaient d'exprimer les gènes des inserts supposés provenir de bactéries phylétiquement éloignées d'*E.coli*⁵³. Suivant les objectifs recherchés, le clonage sera réalisé dans des vecteurs plasmidiques, fosmidiques ou BAC (chromosome bactérien artificiel) afin de générer des clones recombinants avec des inserts de respectivement petite (<10 kb), moyenne (40 kb) ou grande (>100 kb) taille. Ces banques de clones seront criblées afin de détecter les clones contenant des gènes d'intérêt soit via un criblage moléculaire (recherche de séquences par

hybridation ou PCR), phénotypique (recherche d'un phénotype particulier des clones suite à l'expression des gènes des inserts) ou chimique (analyse des surnageants de culture en vue de détecter des composés synthétisés par la bactérie suite à l'expression des gènes des inserts). Une fois repérés les clones sont traités en vue d'extraire les plasmides, fosmidés ou BACs recombinants, sous-clonés ou directement séquencés.

La seconde approche d'exploitation de l'ADN métagénomique implique son séquençage direct sans étapes de clonage ou de PCR, rendu possible par le développement des nouvelles techniques de séquençage à très haut débit⁵⁴. Les approches bioinformatiques permettent alors de décrire le potentiel microbien d'un environnement du fait d'une assignation des cadres ouverts de lecture identifiés à des catégories taxonomiques ou fonctionnelles. Ces études peuvent se compléter, à l'aide des outils statistiques appropriés, d'une comparaison entre environnements différents (marins, terrestres, inféodés à des organismes supérieurs) de façon à déterminer la spécificité de ces écosystèmes tant en termes taxonomique que fonctionnel^{55,56}. Toutefois, un des objectifs d'une combinaison des approches métagénomiques, de séquençage très haut débit et de bioinformatique est de pouvoir reconstituer la séquence totale de génomes de bactéries colonisant ces écosystèmes à partir du seul ADN extrait de la communauté^{57,58}. Ce n'est en effet que par cette reconstitution de génomes totaux (dans une démarche similaire à celle sur des isolats) que pourra être initiée une véritable étude génomique de la microflore environnementale. De telles données, à partir du moment où elles concerneront une proportion significative des populations, permettront d'affirmer les relations entre structures taxonomiques et fonctionnelles, de définir les potentialités synergiques entre organismes, de comprendre les causes de la valeur adaptative de chaque population, de révéler le rôle de la diversité infra-spécifique, du potentiel adaptatif par transfert horizontal de gènes etc.

C'est également de ces données que pourra être développée une véritable stratégie de « métagénomique inverse », consistant à définir d'après la séquence les besoins nutritionnels et métaboliques de chacune de ces populations, de façon à mettre au point les milieux et conditions de culture susceptibles de permettre leur propagation en culture pure. C'est de la combinaison de ces différentes approches que le fonctionnement des écosystèmes pourra réellement être pris en compte, que sera dévoilé le rôle de la redondance taxonomique et fonctionnelle et établi le potentiel de résilience. Ces informations seront particulièrement importantes pour adapter le potentiel microbien à l'épuration des milieux naturels perturbés plus ou moins gravement par les activités anthropiques polluantes et anticiper les perturbations liées au changement climatique et tenter d'en limiter les effets.

II-2-3. *Apports et limites de la métagénomique*

L'approche métagénomique perçue selon les stratégies présentées ci-dessus a été appliquée à de très nombreux écosystèmes incluant le sol^{59,60,61}, les océans⁵⁴, la flore digestive humaine^{62,63},

animale^{64,65}. Ces travaux ont contribué à révéler toute une étendue de la diversité bactérienne, tant au niveau taxonomique que fonctionnel.

A titre d'exemple, l'analyse métagénomique des échantillons d'environnements marins collectés lors d'une seule campagne d'échantillonnage a révélé la présence de plus de 1800 espèces génomiques bactériennes dont 148 genres étaient totalement inconnus jusqu'à ce jour car non cultivés. Le niveau fonctionnel est tout aussi saisissant avec plus de 1,2 millions de nouveaux gènes détectés⁶⁶. La diversité bactérienne est donc bien supérieure à ce qui avait été estimé d'après les travaux sur des isolats, avant l'ère de l'approche métagénomique. Cependant, l'extrême diversité bactérienne combinée à une répartition quantitative hétérogène des cellules entre les différentes populations (depuis les dominantes jusqu'aux rares) et une complexité physico-chimique de certaines matrices comme le sol ou les sédiments qui biaisent considérablement l'extraction de l'ADN ne permettent que très rarement d'atteindre l'objectif ultime qui est la reconstruction de génomes totaux individualisés⁵⁸. Seuls les environnements caractérisés par des conditions physico-chimiques drastiques imposant une réduction de la diversité bactérienne et la sélection d'un faible nombre de populations adaptées ont permis d'assembler les séquences jusqu'à la reconstitution totale des différents réplicons de plusieurs espèces bactériennes⁵⁷. Par contre, de tels résultats n'ont pu être atteints pour des environnements plus classiques : le sol, l'environnement marin, celui du tube digestif humain ou animal, malgré les efforts de séquençage très importants, à la limite des possibilités techniques actuelles^{67,68}.

Confrontée à l'extrême diversité et complexité du monde bactérien, l'approche métagénomique montre ainsi ses limites. Il ne fait cependant aucun doute qu'un décryptage exhaustif au sein de ces environnements complexes passera par une combinaison d'approches complémentaires à la métagénomique visant à réduire au préalable la diversité bactérienne. Si la culture *in vitro* isole les bactéries, en réduit la diversité et pourrait favoriser l'approche métagénomique par un séquençage systématique du génome des souches bactériennes disponibles dans les collections, il n'en demeure pas moins que cette stratégie donne une vision *a priori* encore non exhaustive de la diversité puisque comme nous l'avons vu moins de 1 % des bactéries restent cultivables malgré les efforts continus pour la mise en culture d'une proportion de plus en plus importante des populations bactériennes.

III) INTRODUCTION AU SUJET DE THESE

C'est à partir du constat des limites des méthodes que nous venons de détailler qu'a été initié ce sujet de thèse puisqu'il se propose d'aborder une troisième voie d'étude de la diversité bactérienne, désignées sous le terme de technique de tri cellulaire, et qui est basées sur l'extraction directe et ciblée de bactéries à partir d'un échantillon environnemental⁶⁹. Sans étape de mise en culture, cette stratégie n'est pas sans rappeler l'approche métagénomique. Elle s'en différencie toutefois par le ciblage de bactéries identifiées d'après des critères soit taxonomiques soit fonctionnels à l'instar de l'approche basée sur la culture.

Une fois les cellules cibles isolées, en faisant de l'ADN de la cellule l'objet de l'étude comme c'est le cas avec les travaux de génomique sur les isolats et avec l'ADN métagénomique extrait de l'environnement, cette stratégie donne la possibilité d'assembler entièrement les génomes et donc d'accéder à une véritable étude de toutes les bactéries indépendamment de leur potentiel à être cultivé *in vitro*.

Dans le cadre de cette thèse nous développerons un nouveau système de tri cellulaire dont l'isolement sélectif fera appel au marquage de bactéries sélectionnées par des nanoparticules magnétiques afin de les séparer du reste de la communauté ainsi que des contaminants physiques par attraction sur un réseau de microaimants intégrés dans un canal microfluidique. Ciblées sur des critères taxonomiques après hybridation *in situ* avec des sondes d'acides nucléiques biotinylés complémentaires d'une région spécifique du gène 23S rRNA, les cellules bactériennes hybridées seront marquées magnétiquement après réaction de la sonde avec des nanoparticules fonctionnalisées par des molécules de streptavidine. Nous montrerons également une autre application potentielle du marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques dans le cadre d'études sur le transfert horizontal de gènes. Cette stratégie pourrait en effet permettre de suivre la dissémination de plasmides au sein d'une communauté de bactéries dont même celles appartenant à la fraction non cultivable. Ayant acquis le plasmide marqué, elles pourront être capturées sur les micro-aimants permettant à la fois leur détection et leur identification.

Dans le chapitre I, nous présenterons diverses techniques de tri cellulaire afin de répertorier les solutions envisageables. C'est sur la base de cet inventaire, abordant atouts et inconvénients des différentes techniques existantes, que nous justifierons le choix de développer un outil de tri cellulaire magnétique basé sur l'intégration d'un réseau de micro-aimants permanents dans un système microfluidique, décrit au chapitre II.

Il s'agira ensuite de démontrer l'intérêt de l'outil développé pour les applications en microbiologie environnementale. Dans le chapitre III, nous montrerons que ce dernier permet de réaliser une extraction spécifique de bactéries marquées magnétiquement sur des critères taxonomiques. Nous jugerons des performances du système de tri développé et nous évaluerons son potentiel pour de futures applications. Dans le chapitre IV sera abordé le cas où des bactéries marquées magnétiquement après avoir été transformées par l'ADN conjugué à des nanoparticules magnétiques pourront être spécifiquement sélectionnées sur un réseau de micro-aimants en vue de les étudier.

Une conclusion générale résumera finalement les divers résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et ouvrira sur les différentes perspectives de recherche qu'a généré ce travail.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE
TECHNIQUES DE TRI CELLULAIRE POUR L'ÉTUDE DE LA
DIVERSITÉ BACTÉRIENNE

INTRODUCTION

En cette seconde décennie du XXI^{ème} siècle, les recherches en microbiologie poursuivent l'étude des grands mécanismes physiologiques et génétiques bactériens sur quelques modèles ciblés (*E. coli*, *B. subtilis*) avec une ouverture de plus en plus manifeste sur d'autres espèces grâce au séquençage d'un nombre de plus en plus important de génomes microbiens^{54,59}. Mais les objectifs sont aussi de réaliser un inventaire le plus exhaustif possible de la diversité taxonomique et fonctionnelle de ces organismes dans les différents environnements naturels qu'ils colonisent^{51,70,71}. Le but de ces travaux est double, fondamental pour comprendre notamment les bases moléculaires et physiologiques du potentiel adaptatif et appliqué pour exploiter industriellement ces ressources génétiques quasi-inépuisables.

Dès les premiers âges de la microbiologie, ces études ont été initiées par des approches culturelles reposant sur le développement de colonies à partir de cellules uniques présentes dans un échantillon provenant de l'environnement et étalé sur un milieu de culture solidifié. Toutefois, malgré son utilisation simple et avérée, cette approche à l'origine de tous les travaux en microbiologie depuis l'époque Pasteurienne, a rapidement montré ses limites en ce qui concerne l'étude de la diversité. Seule moins de 1 % de la flore bactérienne totale de nombreux environnements peut actuellement être cultivée *in vitro*, ce qui signifie que les 99 % de bactéries sinon « non cultivables » tout au moins « non cultivées » échappent à toute prise en compte ou exploitation⁷².

Stimulée par des performances sans cesse croissantes au niveau du séquençage, la métagénomique a pu être considérée pendant un temps comme l'approche susceptible d'apporter une réponse définitive à la question concernant l'étude exhaustive de la diversité génétique bactérienne environnementale tant au niveau taxonomique que fonctionnel et même son exploitation. Cependant, les limites de l'approche et son incapacité à répondre seule à l'analyse de la biodiversité bactérienne⁶⁸ ont été rapidement atteintes en raison de l'existence de biais méthodologiques (pour l'extraction de l'ADN, le clonage, la PCR et erreurs de séquençage et d'annotation) combinés à la découverte d'un niveau de diversité encore plus important que ce qui était initialement envisagé, notamment dans des environnements complexes comme le sol. Par exemple, comme nous l'avons énoncé en introduction, la reconstruction complète de génomes à partir de l'ADN métagénomique extrait du sol s'avère totalement impossible même pour les bactéries les plus fortement représentées et ce en dépit d'important efforts de séquençage⁵⁸. Etape essentielle pour comprendre les mécanismes écologiques mis en jeu au sein des écosystèmes, l'assemblage d'un nombre significatif de génomes permet de mesurer l'efficacité de l'approche en regard du niveau de diversité présente. Le fait que cette reconstruction génomique soit impossible pour les microorganismes du sol démontre que des approches alternatives et complémentaires doivent encore être développées pour aborder de façon satisfaisante la microbiologie environnementale.

L'une des approches envisageables consiste à cibler au sein de la communauté bactérienne des cellules sur des critères taxonomiques ou fonctionnels pour ensuite spécifiquement appliquer à ces « isolats » les développements méthodologiques de la métagénomique. En réduisant le niveau de diversité du métagénome au génome unique, cette approche combine l'intérêt de préserver la structure cellulaire à la possibilité d'assembler un génome et donc d'accéder à une véritable étude génomique de cet organisme indépendamment de son potentiel à être cultivé *in vitro*. En théorie, son application à chacune des cellules présentes dans un échantillon environnemental pourrait permettre le décryptage, population après population, de l'ensemble de la communauté, y compris les espèces les plus rares.

Le premier défi que doit relever cette approche sera de pouvoir spécifiquement identifier et séparer les cellules sélectionnées par l'expérimentateur au sein de la communauté en vue de leur étude extérieure. Diverses méthodes ont été développées et c'est dans ce contexte que se positionne ce chapitre bibliographique dont l'objectif sera d'inventorier les différentes techniques d'isolement cellulaire en identifiant pour chacune d'entre elles les avantages et limitations qui justifieront les approches originales que nous avons développées pendant la thèse.

I) LE TRI CELLULAIRE - Généralités-

Le tri cellulaire permet de séparer physiquement des cellules spécifiques à partir d'un mélange cellulaire complexe. Il n'y a pas de procédures de culture et les bactéries recherchées vont être physiquement séparées des autres par des technologies qui consistent à sélectionner certains types bactériens et à les isoler grâce à la reconnaissance d'une propriété distinctive particulière.

A partir d'un échantillon environnemental, des traitements sont d'abord appliqués pour extraire l'ensemble des cellules bactériennes. Les bactéries d'un sol pourront par exemple être extraites par centrifugation en gradient de densité⁷³. Pour des échantillons aquatiques, des procédures de filtration seront le plus souvent envisagées⁷⁴. Dans le cas d'environnements gazeux, des méthodes d'impaction, la filtration ou la précipitation électrostatique pourront être appliquées⁷⁵⁻⁷⁷.

La distinction des cellules bactériennes s'effectue ensuite selon deux grands types de critères. Des critères intrinsèques aux cellules peuvent ainsi être pris en compte. Il s'agira de distinguer les cellules cibles selon leur morphologie par exemple ou selon certaines de leurs propriétés optiques ou diélectriques. Certaines propriétés d'autofluorescence, ou liées à l'existence d'un magnétisme intrinsèque (cas des bactéries magnétotactiques) pourront également être exploitées. Mais dans le cas où ces différences intrinsèques ne suffiraient pas à établir une assez grande distinction entre les cellules recherchées et les autres, des différences extrinsèques peuvent être introduites. Il s'agira d'employer des marqueurs qui viendront se lier spécifiquement aux cellules et qui seront couplés à des molécules de reconnaissance pour conférer une propriété distinctive aux cellules cibles.

Dans la suite de ce chapitre, nous aborderons les différentes approches de marquage spécifique permettant l'octroi de propriétés fluorescentes ou magnétiques aux cellules bactériennes, celles-ci étant les plus communément exploitées. Nous exposerons ensuite les techniques qui permettent de séparer les cellules porteuses de l'un de ces deux types de marqueurs de celles non marquées. Dans ce contexte, nous comparerons deux approches technologiques : les méthodes conventionnelles qui réalisent le tri cellulaire à grande échelle et les systèmes miniaturisés qui apparaissent aujourd'hui comme de plus en plus avantageux pour la recherche et les applications en microbiologie.

II) MARQUAGE SPÉCIFIQUE DES CELLULES BACTÉRIENNES

Le ciblage des cellules bactériennes peut être motivé par des objectifs liés à la taxonomie de ces microorganismes (ex. isoler des cellules appartenant à des taxa ne comprenant pas de représentants isolés en culture pure) ou à leurs fonctions (ex. des bactéries capables de dégrader tel ou tel contaminant). Néanmoins, puisqu'il s'agit de l'un des sujets abordés au cours de cette thèse, nous évoquerons aussi dans ce chapitre le cas où le marquage vise à suivre l'acquisition de gènes par des cellules bactériennes par transfert horizontal.

La plupart du temps, la spécificité d'un marquage va être assurée par l'exploitation d'interactions de type ligand/récepteur permettant de cibler des molécules ou des spécificités de ces molécules (ex. la séquence d'un fragment d'ADN) associées spécifiquement à certaines cellules. Le marquage peut ainsi reposer sur la reconnaissance antigène-anticorps (l'immunomarquage) ou sur l'emploi d'une sonde capable de s'hybrider avec une séquence d'ADN cible située sur le génome de la bactérie (l'hybridation *in situ*). Pour le cas des transferts horizontaux de gènes, un produit d'expression génétique permettra de mettre en évidence l'acquisition d'un gène. Nous décrirons chacun de ces marquages dans les paragraphes qui suivent.

II-1. Marquage antigénique : l'immunomarquage

Les bactéries présentent à leur surface des molécules dites antigéniques (et dès lors appelées antigènes), ayant la capacité de se lier à des anticorps. Ce sont le plus souvent des protéines, des peptides ou des polysaccharides constitutifs de la paroi bactérienne. Certains antigènes seront spécifiques à un type bactérien particulier. Pour ne citer que quelques exemples d'antigènes distinctifs connus, on peut présenter les antigènes C et M reconnus dans le groupe des *Streptococcus* et qui participent sous certaines conditions à l'identification et à la classification de la plupart des bactéries de ce genre^{78,79}. De même, chez les Entérobactéries, trois types d'antigènes (les antigènes O, H et K) sont généralement utilisés comme marqueurs de différenciation entre certaines souches bactériennes⁸⁰⁻⁸². Ainsi, la bactérie pathogène *Escherichia coli* O157:H7 est désignée par son sérotype, O157:H7, parce qu'elle exprime le 157^{ème} antigène O et le 7^{ème} antigène H décrits⁸³.

Les déterminants antigéniques ont la particularité de contenir des sites de reconnaissance moléculaire, appelés épitopes, sur lesquels peuvent se fixer spécifiquement des molécules appelées anticorps. Généralement, un antigène peut posséder plusieurs épitopes différents qui seront autant de sites de liaison pour des anticorps. Un anticorps pourra reconnaître plusieurs épitopes, on parlera alors d'anticorps polyclonal, ou un seul épitope auquel cas il s'agira d'anticorps monoclonal. Il va de soi que les anticorps polyclonaux seront moins spécifiques que les anticorps monoclonaux mais qu'au contraire leur utilisation présentera une plus grande sensibilité. Quoiqu'il en soit, cette réaction antigène-anticorps, qui est à la base de l'immunologie, va permettre de distinguer entre elles des souches au sein des espèces.

Des anticorps conjugués à des fluorophores (immunofluorescence) ou à des particules magnétiques (immunomagnétisme) garderont la capacité de se fixer spécifiquement aux cellules d'intérêt et permettront de ce fait de les reconnaître. Cette méthode de marquage spécifique, appelée immunomarquage, sera par la suite exploitée pour trier les cellules (cf. figure I-1). La technique utilisant des anticorps fluorescents n'est pas récente puisqu'elle a été élaborée en 1941 puis appliquée en 1942 par Coons *et al.*^{84,85} dans le but de localiser des antigènes dans les tissus de mammifères. Par la suite, cette méthode a été utilisée pour localiser certains microorganismes et notamment des bactéries. Le premier article qui décrit l'utilisation de l'immunofluorescence dans l'étude des bactéries est celui de Hobson et Mann⁸⁶ paru en 1957. Les auteurs ont employé l'immunomarquage avec des anticorps fluorescents pour détecter *in situ* des bactéries du rumen. Depuis, un très grand nombre d'études ont fait mention de cette technique et l'immunomarquage de cellules bactériennes, fluorescent et magnétique s'est largement répandu en microbiologie. La table I-1 liste quelques exemples d'organismes ayant fait l'objet d'une détection par immunofluorescence ou immunomagnétisme dans différents domaines d'application.

L'immunomarquage est une technique de détection et d'identification de cellules qui offre plusieurs avantages, le principal étant, notamment pour l'utilisation d'anticorps monoclonaux, sa grande spécificité qui subsiste même en présence d'un nombre élevé de molécules contaminantes⁸⁷. De plus, l'utilisation d'anticorps spécifiques offre un moyen particulièrement sensible pour identifier des micro-organismes sans aucune étape de culture. Par ailleurs, l'immunomarquage permet de garder viables les cellules marquées, permettant ainsi d'effectuer subséquemment d'autres types d'analyses.

Toutefois, l'utilisation des techniques d'immunomarquage en microbiologie est limitée par la nécessité de récupérer suffisamment de molécules antigéniques pour produire des anticorps, ce qui restreint son application aux seules bactéries capables de se développer en culture pure. Cette approche a donc largement été réservée à la détection de bactéries bien caractérisées même s'il est possible d'obtenir des anticorps pour le marquage d'une protéine catalysant une fonction spécifique chez une souche bactérienne cultivée et de les diriger contre d'autres bactéries non cultivables partageant cette même fonction⁸⁸.

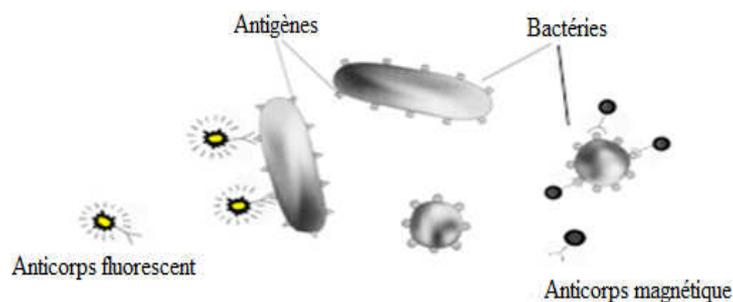


Figure I-1. Principe général de l'immunomarquage

Domaine d'application	Exemples d'organismes cibles	Références
Microbiologie alimentaire	<i>Salmonella spp.</i> *	Mansfield et Forsythe 2000 ⁸⁹
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 **	Tu <i>et al.</i> 2009 ⁹⁰
	<i>Listeria monocytogenes</i> *	Donnelly et Baigent 1986 ⁹¹
	<i>Helicobacter pylori</i> **	Best <i>et al.</i> 1992 ⁹²
Microbiologie clinique	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Liao <i>et al.</i> 1998 ⁸¹
	<i>Legionella spp.</i> **	Cherry <i>et al.</i> 1978 ⁹³
	<i>Yersinia pestis</i> **	Williams <i>et al.</i> 1988 ⁹⁴
Microbiologie environnementale	<i>Nitrosomonas spp.</i> **	Ward et Carlucci 1985 ⁹⁵
	<i>Thermodesulfobacterium spp.</i> *	Waters <i>et al.</i> 1992 ⁹⁶
Pathogène de plante	<i>Erwinia carotovora spp.</i> **	Toth <i>et al.</i> 1999 ⁹⁷

Table I-1. Applications de l'immunomarquage (*magnétique ; **fluorescent) en microbiologie.

Un exemple illustrant ce principe d'immunomarquage bien qu'il ne soit pas directement appliqué à des bactéries est celui rapporté par Orellana *et al.*⁹⁸. Les auteurs ont produit à partir d'une plante un anticorps dirigé contre la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RUBISCO) - l'enzyme responsable de la fixation biologique du dioxyde de carbone (CO₂) - et l'ont utilisé par la suite pour détecter cette enzyme chez des organismes phytoplanctoniques. Les résultats de cette approche ne sont toutefois pas garantis en raison de l'incapacité des anticorps ciblant une beta-lactamase (responsable de la résistance des bactéries à certains antibiotiques, les beta-lactamines) d'*Haemophilus influenzae* à reconnaître les beta-lactamases d'autres espèces bactériennes⁹⁹. Enfin, quelle que soit la nature de l'anticorps employé pour l'immunomarquage, la procédure de production de ces anticorps est souvent longue, coûteuse et est soumise à de nombreuses directives d'éthique du fait de l'emploi d'animaux utilisés pour la production des anticorps, autant de limitations qui contribuent à restreindre l'utilisation des techniques d'immunomarquage. Malgré tout, lorsque la production d'anticorps *ad-hoc* est finalisée, l'immunomarquage constitue une méthode rapide, pouvant être du niveau de spécificité et de sensibilité requis et donc particulièrement pertinente pour marquer des cellules bactériennes.

II-2. Ciblage génétique : l'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique de biologie moléculaire qui permet de mettre en évidence des séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN) spécifiques à l'intérieur des cellules. Cette méthode repose sur les propriétés d'appariement des brins complémentaires d'acides nucléiques. D'une manière générale, après avoir déterminé une séquence d'acides nucléiques spécifique appartenant à un organisme, une sonde nucléotidique complémentaire est synthétisée puis dirigée contre les cellules d'intérêt. Cette sonde portera un conjugué fluorescent (ou permettra l'ancrage d'une molécule fluorescente) - on parlera alors d'hybridation fluorescente *in situ* - ou bien permettra un marquage magnétique, auquel cas il s'agira d'une hybridation magnétique *in situ*.

D'un point de vue expérimental, les cellules sont d'abord fixées par un agent chimique pour garder leur intégrité cellulaire. Eventuellement, les cellules peuvent être perméabilisées pour que la sonde puisse plus aisément accéder à sa cible intracellulaire. L'hybridation *in situ* fait ensuite appel aux propriétés moléculaires des acides nucléiques, à savoir la possibilité de dénaturer des brins d'ADN en deux simples brins et de les réassocier par un juste choix de milieux réactionnels et de conditions opératoires. Ainsi, il est possible de marquer un ADN avec une sonde simple brin complémentaire à une portion de cet ADN en rajoutant la sonde à la solution d'ADN après dénaturation et en phase de réassociation. Les conditions d'hybridation de la sonde seront choisies de telle sorte que le lien s'établisse uniquement entre la sonde et la séquence cible de l'ADN (figure I-2). Des étapes de lavages peuvent aider ensuite à limiter les hybridations non spécifiques éventuelles. Il existe dans la littérature des revues très complètes abordant l'aspect pratique, technique ainsi que les problèmes rencontrés dans les procédures d'hybridation *in situ*^{38,100,101}.

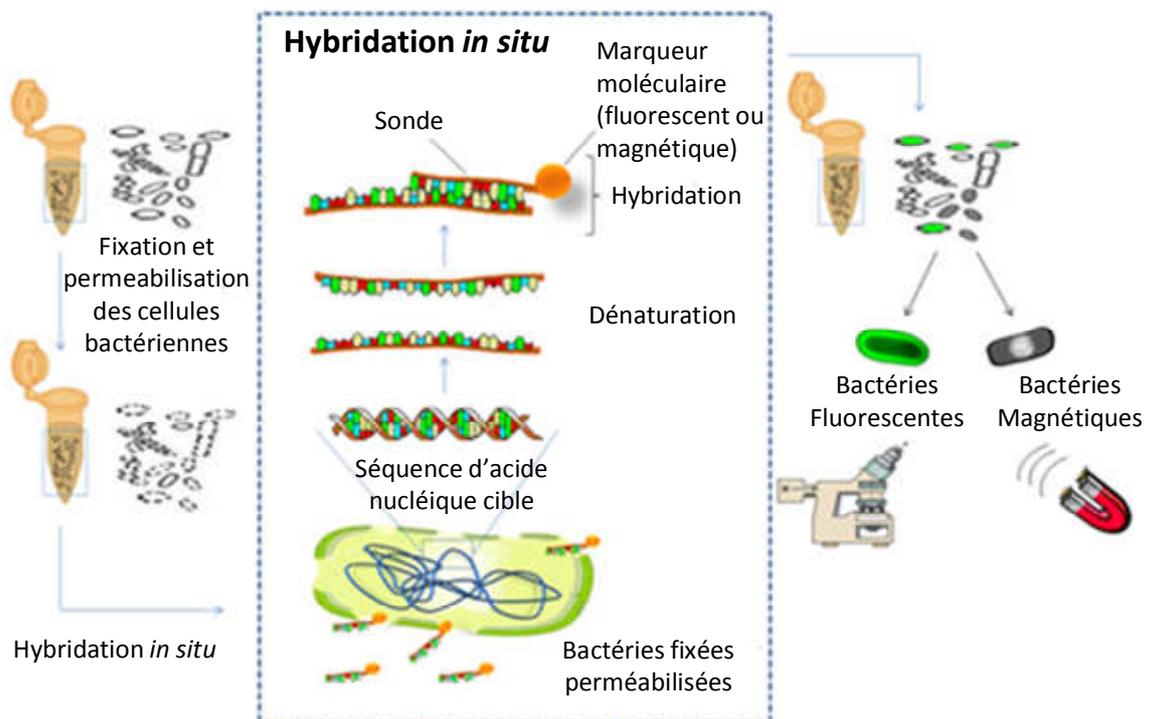


Figure I-2. Principe général de l'hybridation *in situ* (fluorescente ou magnétique)

L'hybridation *in situ* présente l'avantage de ne pas nécessiter l'isolement préalable en culture pure du ou des micro-organismes ciblés, requis généralement dans le cas de l'immunomarquage pour produire les anticorps. En effet, l'hybridation *in situ* ne dépend que de l'obtention d'une séquence d'ADN (ou d'ARN) qui peut être obtenue par séquençage de l'ADN « environnemental » et utilisée pour synthétiser une sonde *in vitro*. Cependant, les cellules marquées par ce procédé ne sont plus viables suite à l'étape de fixation nécessaire à l'hybridation. Elles restent toutefois génétiquement intègres pour des applications génomiques ultérieures.

II-2-1. *Cible de l'hybridation in situ*

L'hybridation *in situ* peut permettre d'établir un marquage sur des critères taxonomiques ou fonctionnels. Dans les paragraphes suivants, nous nous attacherons à présenter les séquences représentatives d'un critère taxonomique ou fonctionnel sur lesquelles seront définies les sondes poly ou oligonucléotidiques, puis nous décrirons les différents aspects des techniques d'hybridation fluorescente et magnétique *in situ*.

II-2-1-1. *Ciblage taxonomique par hybridation in situ*

Les ARN ribosomiques (ARNr 16 et 23S), ubiquistes dans le monde du vivant du fait de leur rôle clé dans la traduction de l'ARN messager (ARNm) en protéines, se caractérisent par des gènes dont la séquence nucléotidique est conservée proportionnellement à la proximité phylogénétique entre organismes considérés. La forte contrainte fonctionnelle exercée tout au long de l'évolution a façonné des gènes présentant une série de régions conservées, de régions variables et d'autres hypervariables, ce degré de variabilité pouvant être convenablement exploité pour les analyses phylogénétiques et la délimitation d'espèces. Il convient de citer les travaux pionniers réalisés par Carl Woese en 1987¹⁰² à l'origine de tous ces développements conceptuels et technologiques. Ces séquences, tant au niveau de l'ADN que de l'ARN sont les cibles les plus couramment utilisées pour un marquage taxonomique des organismes et en particulier des bactéries (cf. figure I-3). La définition de sondes nucléiques pour un marquage génétique des espèces ou des sous-espèces bactériennes peut être établie à partir des régions les plus variables de l'ARN ribosomique^{103,104, 105}. En ciblant des régions plus conservées, les sondes peuvent être conçues pour annexer des groupes de taxa supérieurs¹⁰⁶. Enfin les régions extrêmement bien conservées, dont la séquence est identique entre toutes les espèces bactériennes, permettent la définition de sondes dites « universelles » représentatives du domaine *bacteria*⁷².

C'est principalement au niveau de la petite sous unité ribosomique (16S rRNA) codée par le gène *rrs* que sont caractérisées les sondes taxonomiques du fait de l'accumulation de séquences bactériennes pour ce gène : Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ; ribosomal database project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) ; the European ribosomal RNA database

(<http://www.psb.ugent.be/rRNA/index.html>). Plus de 2 500 000 séquences provenant de tous types d'organismes, y compris des microorganismes non cultivés, sont aujourd'hui disponibles dans ces bases de données.

Les séquences du gène *rrl* (gène de la grande sous unité ribosomique), quoique moins nombreuses dans les bases de données ont également été testées pour leur application générale dans la synthèse de sondes spécifiques. Il a été démontré que la partie variable du domaine III de cet ARNr 23S peut être définie comme une région cible pour l'établissement de sondes spécifiques englobant plusieurs genres bactériens^{107,108,109}. Des bases de données d'ARN 23S sont actuellement en cours de constitution (<http://www.arb-silva.de/>).

II-2-1-2. Ciblage fonctionnel par hybridation *in situ*

La spécificité des bactéries est principalement liée aux fonctions susceptibles d'être réalisées par chacune des différentes populations composant une communauté. Ces fonctions (activité métabolique, production et/ou résistance à un ou plusieurs antibiotiques, dégradation de composés toxiques etc.) sont codées par des gènes localisés sur le chromosome ou sur les éléments accessoires du génome dont les plasmides. Le monde bactérien se caractérise par la redondance fonctionnelle, c'est-à-dire la capacité de populations différentes à réaliser une même fonction. Selon la contrainte exercée, les séquences de ces gènes seront plus ou moins conservées entre les différentes espèces permettant de définir des sondes fonctionnelles de spécificité variable suivant les gènes étudiés et les séquences utilisées.

Utilisées dans le cadre de l'hybridation *in situ* ciblant l'ADN bactérien, ces sondes rendront compte du potentiel fonctionnel des populations ou communautés bactériennes étudiées¹¹⁰⁻¹¹³. Si la cible des sondes est l'ARN messenger présent dans la cellule, la détection des transcrits et leur quantification par ces mêmes méthodes (ou par des approches de PCR quantitative ou de RNAseq) fourniront des informations supplémentaires concernant le niveau d'expression du gène dans les conditions étudiées et conséquemment celui sur la réalisation de la fonction. Ces approches sont très utilisées pour étudier dans différents types d'environnements les différentes fonctions effectuées par des bactéries comme par exemple de mettre en évidence une activité métabolique spécifique : oxydation du méthane¹¹⁴, dégradation de composés toxiques¹¹⁵ par exemple. Ce marquage pourra également être couplé à une reconnaissance taxonomique des cellules auquel cas il sera alors possible d'établir un lien entre structure et fonction au sein de la communauté bactérienne^{116,117}.

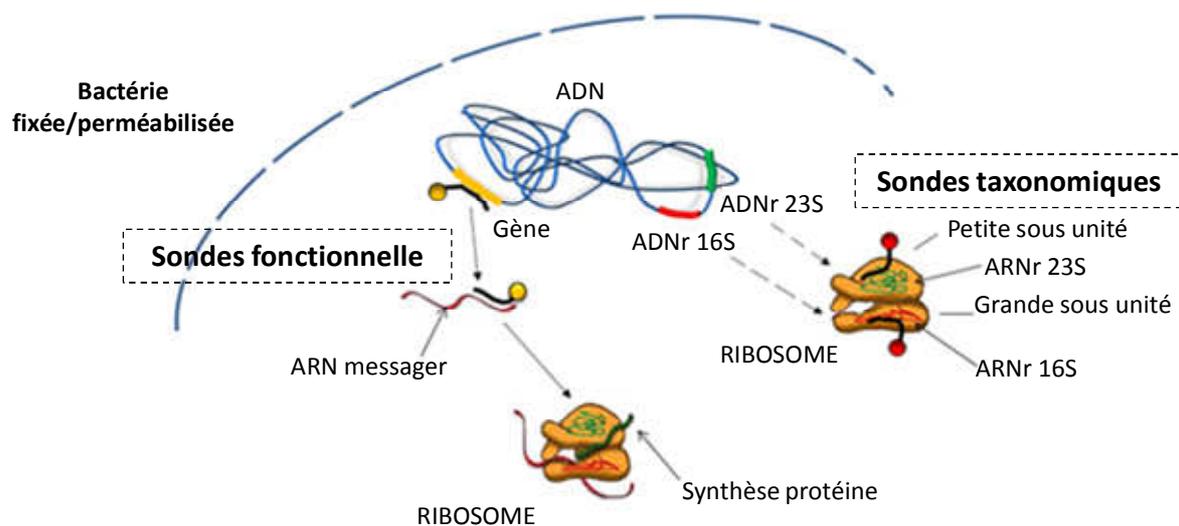


Figure I-3. Représentation schématique du marquage taxonomique et fonctionnel par hybridation magnétique *in situ*.

II-2-2. Définition des sondes

Des sondes spécifiques peuvent être définies *in silico* à l'aide de logiciels tels que ARB¹¹⁸ ou mathfish¹¹⁹, ces outils pouvant permettre selon les cas de cibler spécifiquement une population, un groupe phylogénétique plus large ou une séquence nucléique caractéristique d'une fonction donnée. Pour atteindre le niveau de spécificité désiré, les programmes s'ajustent sur des paramètres tels que la longueur de la sonde, le taux de bases nucléiques G (guanine) et C (cytosine), la région du gène sélectionnée. L'outil informatique peut alors concevoir la sonde et rechercher les sites cibles potentiels dans l'ensemble des bases de données des séquences nucléiques. Une base de données d'ARNr « probeBase » (www.microbial-ecology.net/probebase) mise en place par Loy *et al.*¹²⁰ contenant actuellement plus de 1300 entrées est disponible pour la communauté, évitant la perte de temps liée à une duplication des travaux et permettant une meilleure comparaison inter-laboratoires pour les analyses de communautés.

La plupart des sondes utilisées sont de courtes séquences oligonucléotidiques (entre 15 et 20 bases). Toutefois, des sondes polynucléotidiques (>100pb) peuvent être utilisées même si leur choix peut être discuté. En effet, il est généralement admis que l'utilisation de sondes de plus grande longueur s'avère moins pertinente pour les raisons suivantes¹⁰⁷ : la spécificité de l'hybridation diminue drastiquement avec la longueur des sondes avec un risque accru d'hybridations non spécifiques entre sondes et ADN ou ARN d'organismes présentant une proximité phylétique ou fonctionnelle. Les sondes oligonucléotidiques sont beaucoup plus spécifiques que les sondes polynucléotidiques et permettent parfois, même pour des conditions expérimentales appropriées, de discriminer deux séquences (cible et non-cible) se différenciant l'une de l'autre par un seul nucléotide^{103,121}. Cependant, les sondes polynucléotidiques font aujourd'hui l'objet d'importants travaux afin de résoudre les problèmes de non spécificité. En effet, les sondes polynucléotidiques offrent certains avantages par rapport aux oligonucléotides de synthèse en ce qui concerne le niveau du marquage, point technique qui sera abordé ultérieurement au sein de ce chapitre. Très récemment, le développement d'un logiciel de conception rationnelle de sondes polynucléotidiques a été entrepris, laissant augurer d'intéressants progrès en ce qui concerne la spécificité de ces sondes¹²².

La conception de sondes est également possible par transcription *in vitro* de produits PCR obtenus après amplification d'une matrice d'ADN quelle que soit son origine (ADN environnemental, clones plasmidiques ou fosmidiques etc)^{121,108}. Ces sondes, dénommées polyribonucléiques, trouveront leur utilisation notamment dans le cas de l'hybridation *in situ* utilisant des propriétés magnétiques de criblage.

II-2-3. Marquage fluorescent par hybridation fluorescente *in situ*

II-2-3-1. Les sondes mono-marquées

L'hybridation fluorescente *in situ*, en anglais « *Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)* » est une technique très utilisée pour visualiser, identifier, sélectionner des bactéries selon des critères taxonomiques ou fonctionnels du fait du marquage des sondes par des molécules fluorescentes. Le *FISH* se base sur l'emploi de sondes mono-marquées par un fluorophore. Ce fluorophore peut être incorporé à la sonde au niveau des extrémités terminales des brins d'ADN ou combiné à la sonde postérieurement à l'étape d'hybridation. Dans ce dernier cas, des molécules rapporteuses comme la digoxygénine ou la biotine seront initialement fixées à l'extrémité des sondes. La détection fluorescente nécessitera alors une combinaison avec les ligands fluorescents correspondants à ces molécules (respectivement un anticorps anti-digoxygénine fluorescent ou une molécule de streptavidine fluorescente) (cf. figure I-4).

Quelle que soit l'approche utilisée, le *FISH* est reconnu comme une méthode fiable de marquage fluorescent des cellules bactériennes⁶⁵⁻⁶⁹. Il est limité cependant dans sa sensibilité dans le cas d'un nombre de molécules cibles faible et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques mono-marquées. Les potentialités du *FISH* ont montré leurs limites (inférieures à celles de la détection) pour la mise en évidence des ARNm correspondants à des gènes faiblement exprimés ou des ARNr de bactéries colonisant des échantillons environnementaux où l'activité des cellules microbiennes est peu élevée^{123,128-130}. Si le facteur sensibilité fait l'objet d'une attention particulière, d'autres méthodes d'hybridation fluorescente *in situ* peuvent être employées.

II-2-3-2. Amplification du signal fluorescent

L'accroissement du nombre de fluorophores sur des sondes oligonucléotidiques, nécessairement limité du fait de la faible taille (entre 15 et 20 b) des oligonucléotides, ne s'est traduit que par une augmentation peu significative de l'intensité du signal de détection¹³¹. Le signal de fluorescence peut par contre être significativement amplifié par l'adjonction « d'entités » comme les « quantum dots »⁸¹. Des travaux actuels utilisent des nanoparticules d'or dont l'association avec le fluorophore en améliore les performances de fluorescence, approche très prometteuse pour une amélioration de la sensibilité de la méthode *FISH*⁸².

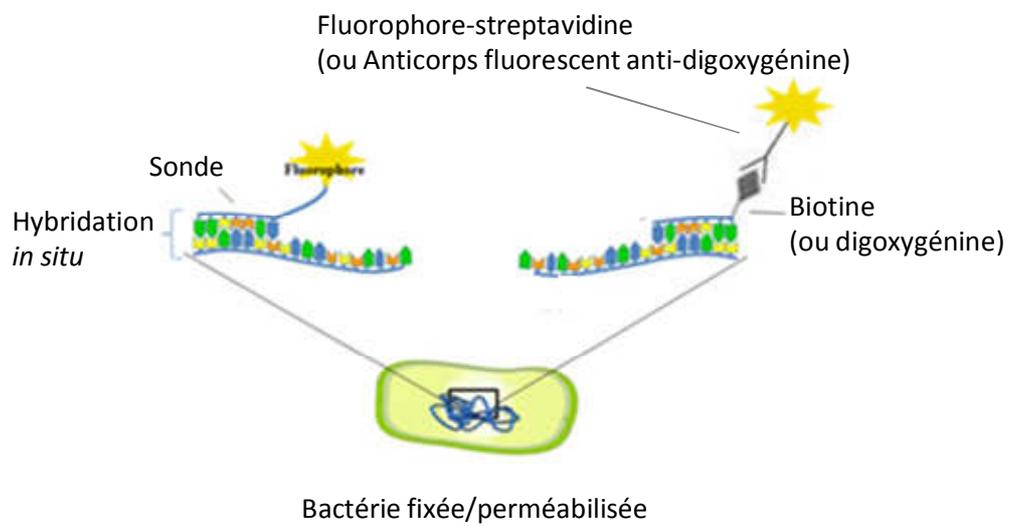


Figure I-4. Représentation schématique des différents types de sondes mono-marquées pouvant être utilisées pour le marquage par FISH.

Il est également possible d'amplifier le signal fluorescent par des méthodes enzymatiques. Dans la technique du (CARD)-FISH - pour *Catalyzed Reporter Deposition Fluorescent In Situ Hybridization* - visant à amplifier le signal de reconnaissance^{112,134} (cf. figure I-5) les cellules cibles sont hybridées avec une sonde oligonucléotidique couplée à une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP) par exemple. Des molécules de tyramide marquées avec un fluorophore inactif sont ensuite ajoutées. La catalyse de la tyramide par la HRP active le fluorophore qui leur est lié, conduisant à une production de fluorescence à l'intérieur de la cellule. Une autre approche enzymatique consiste à utiliser une technique appelée le (RCA)-FISH (*Rolling Circle Amplification Fluorescent In Situ Hybridization*) qui amplifie directement la séquence cible avant sa détection (cf. figure I-6).

Ces deux méthodes améliorent très significativement l'intensité des signaux fluorescents permettant la détection jusqu'à une seule copie du gène cible présent dans le génome d'une cellule bactérienne justifiant leur emploi pour la détection, l'identification et la quantification de bactéries dans leurs milieux naturels. Il arrive cependant que ces approches soient perturbées par la diffusion des grosses molécules que constituent les complexes enzymatiques nécessaires à l'amplification du signal à l'intérieur des cellules procaryotes¹³⁵. Cette limitation pourra être levée par l'inclusion d'une étape supplémentaire de perméabilisation des paroi de la cellule pour permettre l'internalisation du complexe sonde-enzymes sans pour autant provoquer la lyse cellulaire¹³⁴.

Une alternative aux méthodes enzymatiques consiste à utiliser des sondes polynucléotidiques multi-marquées pour amplifier le signal de fluorescence. Leur longueur (>100pb) permet en effet d'augmenter significativement le nombre de marqueurs sur la molécule. Dans ce cas, le nombre de marqueurs couplés à la sonde étant beaucoup plus important, l'intensité du signal fluorescent est significativement accrue en comparaison de ce qui peut être observé avec des sondes polynucléotidiques marquées une seule fois ou des sondes oligonucléotidiques. Cette approche permet alors la détection des bactéries présentant un faible niveau d'ARNr^{108,130,136} ou d'un gène fonctionnel même quand le nombre de copies par cellule est inférieur à 10. L'intensité du signal est naturellement accrue quand sont ciblés dans ces conditions des gènes plasmidiques, sachant que le nombre de copies du plasmide peut atteindre plusieurs centaines par cellule. La sensibilité a cependant pu être accrue jusqu'à pouvoir détecter aussi des gènes chromosomiques¹¹⁰.

Par extension, la combinaison de différentes méthodes d'amplification du signal de détection est aussi possible. Wagner *et al.* ont par exemple combiné l'utilisation de sondes polynucléotidiques avec une méthode de CARD-FISH pour détecter des ARNm de *Listeria monocytogenes*¹³⁷. Cette même méthode a été reprise plus tard par Moraru *et al.* pour détecter certains gènes chez des archae¹¹⁷

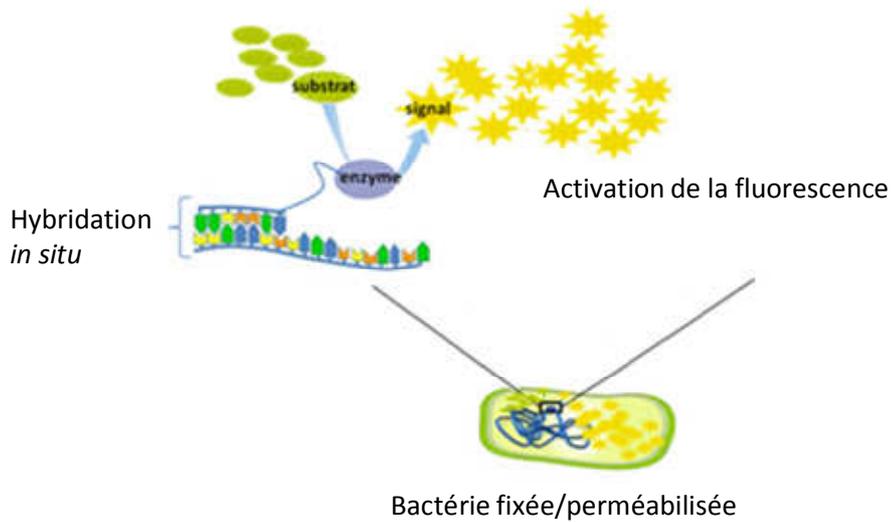


Figure I-5. Schéma de principe du (CARD)-FISH.

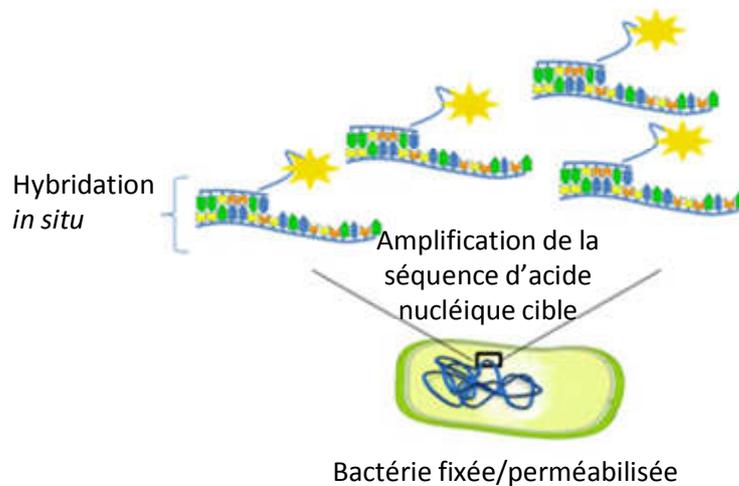


Figure I-6. Schéma de principe du (RCA)-FISH.

II-2-4. Marquage magnétique par hybridation magnétique *in situ*

II-2-4-1. Concept de « *probe-based cell fishing* »

Le concept d'hybridation magnétique *in situ* a été introduit pour la première fois en 1999 par Stoffels et al. (y faisant référence sous l'appellation plus générique de « *probe based cell fishing* »)¹³⁸, mais il a relativement peu été mis en pratique depuis. Les travaux de Stoffels sont eux-mêmes basés sur une observation de Trebesius *et al.* selon laquelle lors d'une hybridation fluorescente *in situ* réalisée avec des sondes polyribonucléotidiques, un halo lumineux entoure la membrane bactérienne alors que l'intérieur de la cellule est faiblement fluorescent¹⁰⁸. Stoffels et ses collaborateurs ont alors émis l'hypothèse que seule une partie de la sonde pénétrait à l'intérieur de la cellule, s'hybridait avec sa cible alors que l'autre partie de la sonde, non hybridée, était alors disponible à l'extérieur de la cellule. Ces auteurs ont alors proposé d'utiliser des sondes polyribonucléotidiques biotinylées pour pouvoir marquer magnétiquement des bactéries avec des particules magnétiques recouvertes de streptavidine, celles-ci pouvant se lier aux biotines présentes sur les fragments de sondes restées en dehors de la cellule. Leur étude montre la capacité de réaliser ce marquage en utilisant des sondes polyribonucléotidiques biotinylées ciblant la région hypervariable du 23S rRNA de plusieurs espèces bactériennes.

En 2003, Zwirgmaier *et al.* ont étudié plus en détail ces mécanismes pour finalement proposer l'hypothèse appelée la « *network hypothesis* »¹³⁹. Cette hypothèse suggère que l'utilisation de sondes polyribonucléotidiques fluorescentes génère un halo autour de la cellule lié à la formation d'un réseau de sondes enchevêtrées les unes dans les autres, grâce à la capacité des ARN simple brin à former des structures secondaires. Cet enchevêtrement est initié par la sonde hybridée *in situ* et se propage pour finalement ressortir de la cellule perméabilisée (cf. figure I- 7). Par la suite, Pratscher et ses collaborateurs¹¹³ ont employé cette hybridation magnétique *in situ* pour isoler des bactéries dénitrifiantes du sol portant le gène *nirK* dont la fonction est impliquée dans la transformation des nitrite (NO₂⁻) en oxyde nitreux (NO).

II-2-4-2. Le magnéto-FISH

Une deuxième approche d'hybridation magnétique *in situ* peut être réalisée en combinant la méthodologie du *CARD-FISH* présentée plus haut avec une étape d'immunomarquage magnétique (cf. figure I-8). Un anticorps couplé à une bille magnétique est alors dirigé contre le fluorophore. Appelée *magnéto-FISH*, cette technique a été employée pour marquer magnétiquement des archées ciblées sur des critères taxonomiques (gène *rrs*)¹⁴⁰.

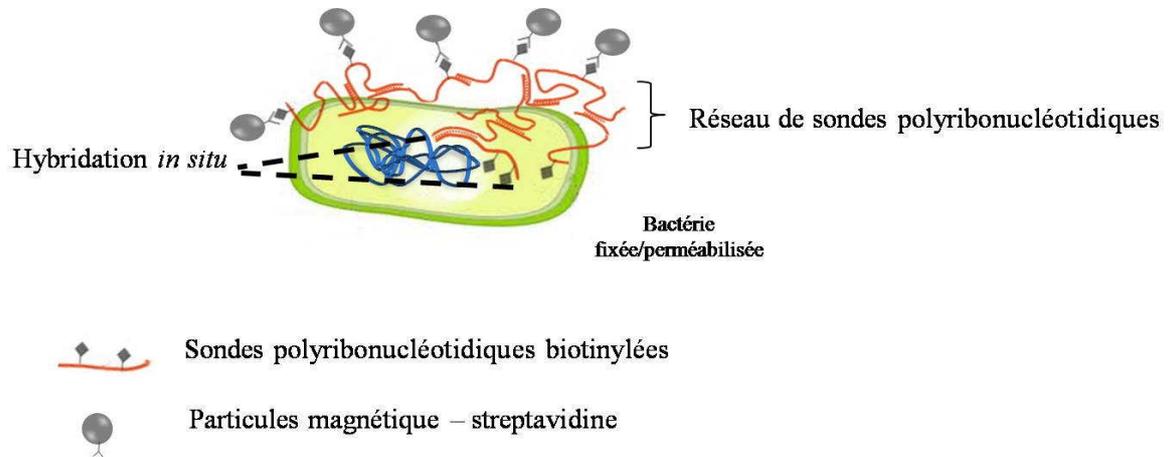


Figure I-7. Schéma de principe de l'hybridation magnétique *in situ* par « probe-based cell fishing ».

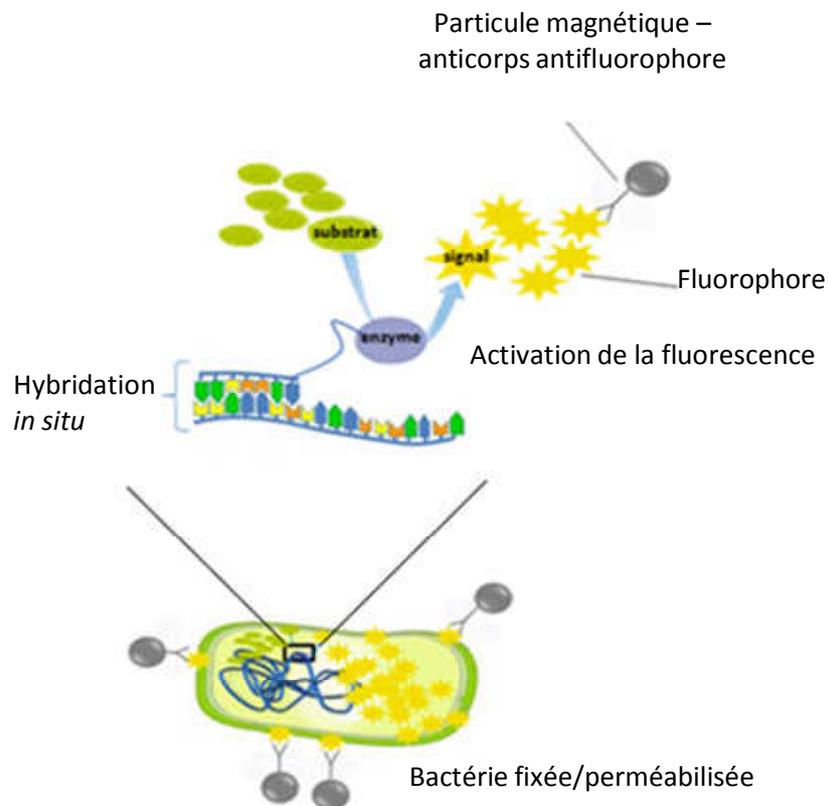


Figure I-8. Représentation schématique de l'hybridation magnétique *in situ* par magnéto-FISH.

II-3. *Les protéines fluorescentes*

Les techniques de marquage par des protéines fluorescentes font appel à l'expression d'un gène codant une protéine naturellement fluorescente comme la *green fluorescent protein* (gfp) ou ses dérivés¹⁴¹.

La GFP a d'abord été largement utilisée en biologie moléculaire comme marqueur d'expression dans l'étude des régulations génétiques¹⁴² ou pour suivre la colonisation de tissus de plantes¹⁴³ ou d'animaux¹⁴⁴ par des bactéries exprimant ce gène. Son application n'est toutefois pas limitée à ce seul objectif, l'expression de protéines fluorescentes pouvant être d'un grand intérêt dans l'étude *in situ* des transferts horizontaux de gènes¹⁴⁵. Cela permet en effet de pouvoir contourner l'étape de culture bactérienne nécessaire classiquement pour la sélection phénotypique du gène transféré (résistance à des antibiotiques, dégradation de polluants, résistance aux métaux lourds...) qui exclut 99 % des bactéries (non cultivables). Cependant si on souhaite étudier les transferts horizontaux de gènes par ce mécanisme, l'expression de la GFP doit être réprimée dans la souche donatrice de façon à ne visualiser exclusivement que les transconjugants. Un système a été développé par Sorensen *et al.* pour réprimer le gène *gfp* porté par un plasmide conjugatif¹⁴⁶.

L'un des autres grands avantages liés à l'utilisation de la GFP est qu'elle permet l'observation de la protéine dans des cellules vivantes qui n'ont pas besoin d'être fixées ou hybridées pour être marquées. Cependant cette technique peut se heurter à des problèmes d'expression hétérologue ce qui signifie que certaines bactéries peuvent ne pas avoir la machinerie cellulaire adaptée à l'expression du gène¹⁴⁷.

III) APPROCHES DE SÉLECTION DES CELLULES BACTÉRIENNES MARQUEES

Après avoir marqué les cellules bactériennes d'intérêt dans un mélange complexe, la deuxième étape va consister à les séparer physiquement du reste de l'échantillon. Les systèmes de tri cellulaire dédiés à cette opération peuvent être classés en deux catégories : ceux basés sur l'exploitation de la fluorescence des cellules et ceux effectuant un tri magnétique. Nous présenterons en premier lieu les techniques conventionnelles, macroscopiques, permettant d'effectuer un tri à grande échelle. Nous décrirons leur fonctionnement et donnerons quelques exemples d'applications en microbiologie. Après avoir passé en revue les avantages et inconvénients de chacune de ces techniques, nous présenterons les raisons ayant orienté nos travaux vers l'emploi des systèmes de tri magnétique miniaturisés.

III-1. *Les trieurs conventionnels de cellules*

III-1-1. *Les trieurs conventionnels de cellules fluorescentes (FACS®)*

III-1-1-1. *Principe du FACS®*

Le tri de cellules fluorescentes est généralement réalisé au moyen d'un cytomètre de flux équipé d'un module dédié. L'acronyme FACS (pour « *Fluorescent Activated Cell Sorter* »), déposé par Becton Dickinson, est très largement employé pour désigner cet équipement. Dans un cytomètre en flux, les cellules sont généralement propulsées à grande vitesse dans un flux hydraulique de très faible diamètre (quelques dizaines de micromètres) autocentré par un second flux liquide qui sert de gaine. Les cellules adoptent ainsi une progression en file indienne et sont acheminées par le fluide devant une fenêtre de détection optique où elles sont irradiées une à une par un laser. Les paramètres de diffusion de la lumière et d'émission de fluorescence des cellules sont collectés au moyen d'un système de couplage optique-électronique qui permet leur enregistrement sur ordinateur. Le traitement des données peut ensuite être effectué par des logiciels d'analyse. Les paramètres enregistrés renseignent sur les propriétés physiques des cellules, notamment leur taille, leur structure interne (granularité), leur fluorescence. Les cellules peuvent être dénombrées suivant ces différents critères.

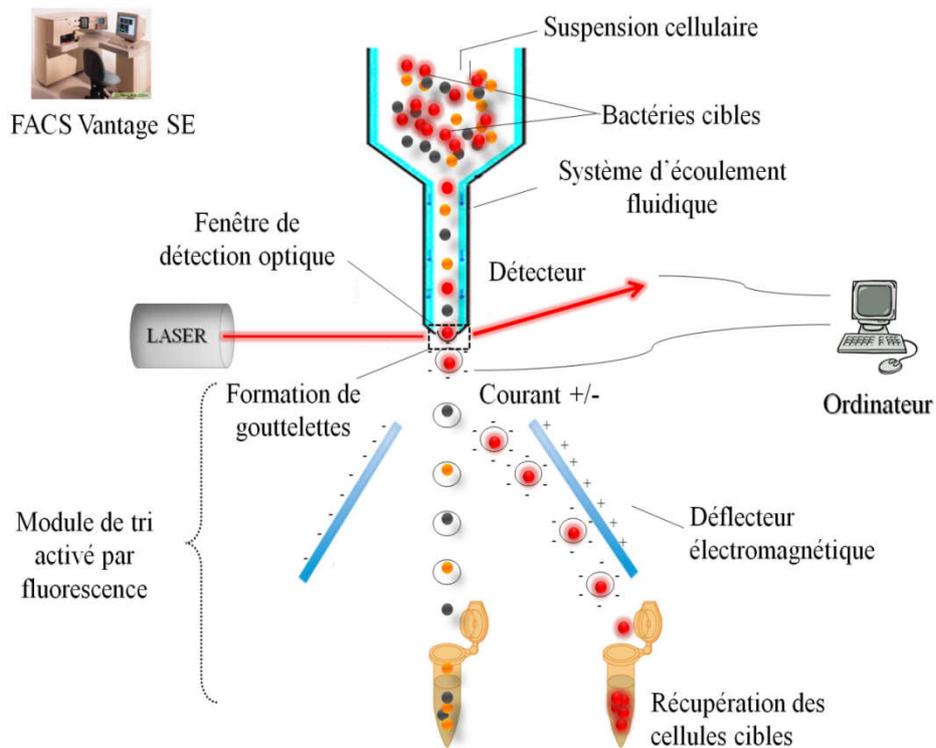


Figure I-9. Principe général du fonctionnement d'un FACS® (ex : FACS Vantage SE)

Les cytomètres en flux équipés d'un module de tri disposent d'un système de vibration qui perturbe le flux juste au moment où les cellules passent devant la zone de détection optique. Le flux liquide est fragmenté en plusieurs milliers de gouttes/s, ce qui conduit à l'emprisonnement de chaque cellule dans une goutte peu après l'analyse dans un délai parfaitement connu par la machine, pendant lequel elle décidera de charger électrostatiquement ou non chaque goutte contenant une unique cellule, en fonction de critères désignés par l'utilisateur (tels que la fluorescence). En fonction de leur charge et donc des caractéristiques des cellules qu'elles transportent, les gouttes sont ensuite déviées par un champ électrique vers différents réservoirs de collecte. Un schéma représentant ce type de système est présenté figure I-9.

III-1-1-2. Apports et limites du FACS®

Le FACS® est un système de tri performant avec des débits de tri très importants pour les appareils les plus modernes (jusqu'à 70000 cellules par seconde pour un appareil tel que le MoFlo® Astrios™ de Beckman Coulter). Le criblage individualisé des cellules (isolées dans des gouttelettes) permet d'obtenir des taux de pureté particulièrement élevés (> 98 %) même dans des échantillons très dilués et si nécessaire de pouvoir isoler des cellules uniques^{148,149}. Ce système fait également du FACS® un outil particulièrement puissant pour la récupération d'événements rares au sein d'un complexe hétérogène⁸⁷.

Cet équipement est de plus en plus utilisé en microbiologie, notamment en microbiologie clinique, alimentaire et environnementale car il se révèle particulièrement sensible et efficace pour la détection rapide de bactéries pathogènes¹⁵⁰. Son utilisation combinée à celle des méthodes d'immunomarquage permet de valider en quelques heures la présence d'une bactérie qui mettrait plusieurs jours à être détectée par les approches classiques de culture. Le tri cellulaire par FACS permet également d'enrichir des populations cellulaires spécifiques non cultivables à partir d'échantillons environnementaux. Des études montrent qu'en combinant l'emploi du FACS avec une approche de marquage (taxonomique ou fonctionnel) basée sur le *FISH*, il est possible d'enrichir des populations bactériennes spécifiques à partir d'environnements complexes^{151,73,152,153,154}. Podar *et al.* ont par exemple montré qu'il était possible par cette méthode d'isoler, de séquencer et de réassembler en partie les génomes d'une sous population bactérienne spécifique (division TM7) non cultivable et faiblement abondante dans un sol⁷³. Difficilement envisageable avec les techniques classiques de métagénomique, l'accès spécifique aux génomes de ces organismes a ainsi pu offrir de précieuses informations sur la biologie de ces bactéries. Avec les mêmes objectifs de caractérisation génétique, Mota *et al.* ont pu procéder à l'identification taxonomique de bactéries nitrite-réductrices dans des communautés microbiennes complexes après avoir isolé ces bactéries sur la base de ce critère fonctionnel (ciblage de l'ARNm du gène *nirS*)¹⁵¹.

Toutefois, l'utilisation du FACS présente quelques limites. L'un des principaux inconvénients de cette technique réside dans le coût très élevé de l'appareillage (~100 000 Euros). Par ailleurs, son utilisation et sa maintenance requièrent la présence d'opérateurs spécialisés. De plus, malgré son potentiel d'application en microbiologie, son efficacité reste souvent limitée en ce qui concerne les environnements complexes comme le sol par exemple. Les principales limitations tiennent à l'autofluorescence de la matrice minérale et organique pouvant nuire à l'efficacité du tri^{87,155-157}. Compte-tenu de ces limitations, une méthode alternative, telle que le tri magnétique, peut alors être préférée.

III-1-2. *Le tri magnétique de cellules*

Il existe deux grandes catégories de méthodes permettant de séparer des cellules : celles employant un marquage magnétique pour sélectionner les cellules et celles exploitant leurs propriétés magnétiques naturelles. Il convient donc de présenter brièvement une classification des matériaux en fonction de leurs propriétés magnétiques, en évoquant notamment celles des objets manipulés (nanoparticules magnétiques, cellules), des milieux dans lesquels ils se trouvent, ainsi que des différents matériaux intervenant dans la composition des systèmes de manipulation (aimants permanents, matériaux doux, etc). Nous décrirons ensuite la force s'exerçant sur un objet en présence d'un champ magnétique, en insistant sur l'importance des différents paramètres intervenant dans son expression, avant de présenter les systèmes de séparation magnétique classiquement utilisés en laboratoire.

III-1-2-1. *Propriétés magnétiques des matériaux*

Les travaux de Faraday (1845) ont permis de montrer que toute substance est capable d'acquérir une aimantation en présence d'un champ magnétique. La susceptibilité magnétique d'un matériau, notée χ (nombre sans dimension), traduit sa capacité à s'aimanter en présence d'un champ d'excitation magnétique (généralement noté \vec{H} et exprimé en A/m), créé à l'aide d'une bobine ou d'un aimant permanent. Dans un matériau isotrope, l'aimantation, représentée par le vecteur \vec{M} , est ainsi liée à l'excitation par la relation: $\vec{M} = \chi \vec{H}$ (A/m). Les matériaux peuvent cependant être classés en trois catégories, selon leur valeur de susceptibilité¹⁵⁸ : diamagnétique ($-1 < \chi < 0$), paramagnétique ($0 < \chi < \sim 0.01$) et ferromagnétique ($\chi > 0.01 \rightarrow \sim 10^5$) (cf. figure I-10).

En fonction du type de matériau, la susceptibilité magnétique peut être constante ou dépendre fortement de l'excitation magnétique \vec{H} ; Ainsi, la relation entre \vec{M} et \vec{H} est linéaire dans le cas des matériaux diamagnétiques et paramagnétiques et non linéaire dans le cas des matériaux ferromagnétiques (cf. figure I-11).

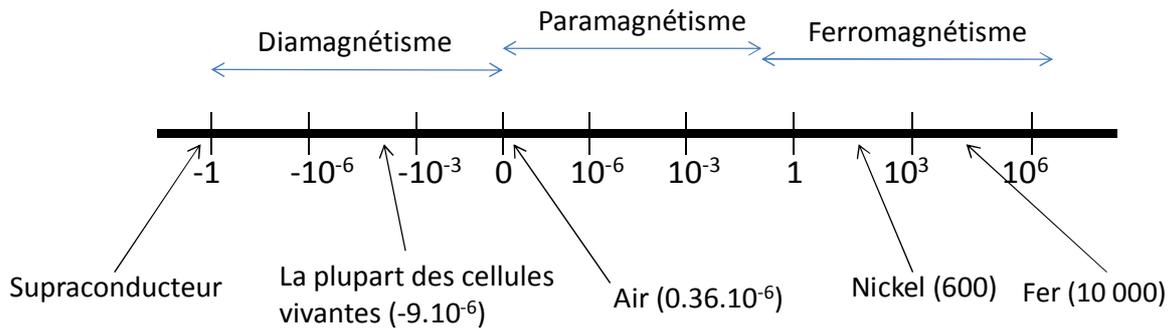


Figure I-10. Echelle de susceptibilités magnétiques volumiques (unité SI)

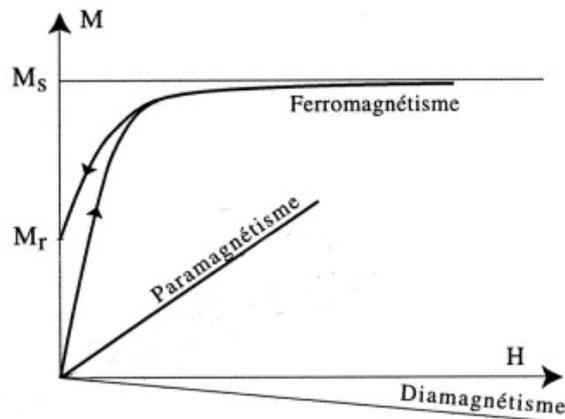


Figure I-11. Courbes $M(H)$ pour des matériaux paramagnétiques, diamagnétiques et ferromagnétiques. Dans le cas des matériaux ferromagnétiques, la courbe $M(H)$ est non linéaire ; M_s représente alors l'aimantation à saturation du matériau et M_r , l'aimantation rémanente.

On comprend alors que le diamagnétisme est un comportement de certains matériaux qui les conduit, lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, à s'aimer dans la direction opposée à celle du champ appliqué. La susceptibilité magnétique des matériaux diamagnétiques est négative et très proche de 0. Celle de l'eau vaut par exemple $-9.05 \cdot 10^{-6}$. La plupart des matériaux biologiques sont également diamagnétiques et leur susceptibilité est généralement comprise dans un intervalle de $\pm 20\%$ par rapport à celle de l'eau. La réponse de ces matériaux au champ d'excitation magnétique est donc très faible.

Le paramagnétisme traduit quant à lui le comportement des matériaux présentant une aimantation proportionnelle au champ dans lequel ils sont placés et de même sens. Le rapport entre l'intensité d'aimantation du corps et celle du champ qui le produit est faible, tout en étant 10 à 1000 fois plus grande que pour les matériaux diamagnétiques.

Les matériaux ferromagnétiques sont capables de s'aimer de manière beaucoup plus forte sous l'effet d'un champ magnétique d'excitation H . Leur aimantation est de même sens que ce dernier. L'aimantation croît rapidement avec H , jusqu'à atteindre la valeur de saturation M_s . Lorsque H est faible, la susceptibilité est maximale (elle vaut 10^4 par exemple pour le fer), puis elle tend à s'annuler lorsque la saturation est atteinte. Si H est ramené à 0, il subsiste cependant une aimantation M_r appelée aimantation rémanente. Pour pouvoir l'annuler, il est nécessaire d'imposer à H une valeur négative H_c appelée excitation coercitive (cf. figure I-12). On distingue alors deux types de matériaux ferromagnétiques : les matériaux doux, qui possèdent une forte aimantation à saturation mais se désaimantent facilement (faible valeur de H_c) et les matériaux ferromagnétiques durs, dont la désaimantation est beaucoup moins aisée (H_c élevé). Ces matériaux présentent un large cycle d'hystérésis. Les matériaux doux sont utilisés pour la réalisation d'électroaimants (aimants commandés par un courant électrique, dont l'aimantation doit pouvoir être facilement annulée), tandis que les matériaux durs, tels que les matériaux à base de terres rares (alliages NdFeB ou SmCo) servent à produire des aimants permanents.

La présence d'une source d'excitation magnétique (H) induit une réponse magnétique que l'on appelle "induction magnétique" et que l'on désigne par B (exprimé en Tesla, T). Dans le vide, l'induction est proportionnelle à l'excitation H et l'on a $\vec{B} = \mu_0 \cdot \vec{H}$ (μ_0 désigne la perméabilité magnétique du vide et vaut $4\pi \cdot 10^{-7}$). Lorsque le champ exciteur crée une aimantation $\vec{M} = \chi \vec{H}$ dans un matériau, cette aimantation produit une induction $\mu_0 \vec{M}$ dans le matériau, qui s'ajoute au champ $\mu_0 \vec{H}$ produit par le champ exciteur seul. L'induction résultante dans le matériau vaut alors $\vec{B} = \mu_0(1 + \chi)\vec{H}$, tandis qu'elle vaut $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$ en dehors. Ainsi, un matériau ferromagnétique joue un rôle d'amplificateur considérable. A titre d'exemple, l'induction obtenue dans un matériau tel que le fer peut être 10000 fois plus élevée que dans le vide.

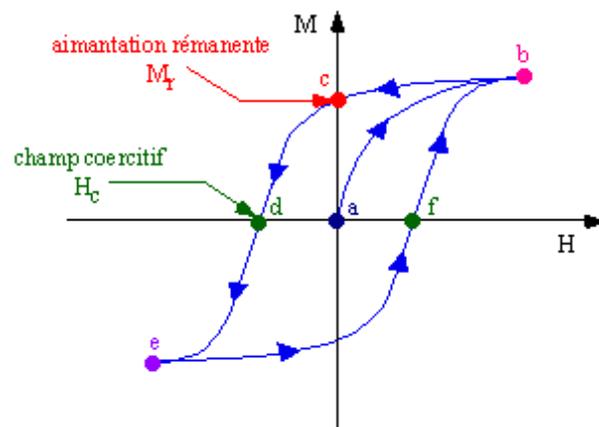


Figure I-12. Cycle d'hystérésis M en fonction de H pour une substance ferromagnétique

Les lignes de champ sont fortement canalisées par le matériau, comme indiqué figure I-13. En revanche, dans le cas des matériaux de faible susceptibilité, comme les matériaux biologiques, l'induction résultante est similaire à celle obtenue dans le vide ($\vec{B} = \mu_0 \cdot \vec{H}$). Autrement dit, l'aimantation induite dans le matériau est négligeable devant le champ d'excitation.

Le superparamagnétisme est un comportement des matériaux ferromagnétiques lorsque ceux-ci se présentent sous la forme de petits grains ou de nanoparticules. Comme dans les matériaux paramagnétiques, l'aimantation apparaît en présence d'un champ d'excitation et disparaît quand ce champ est coupé. Il n'y a donc pas de rémanence, à l'inverse de ce qui est observé pour le matériau massif, ce qui présente l'avantage d'éviter les problèmes d'agrégation des particules sous l'effet d'interactions dipolaires magnétiques. La susceptibilité de ces matériaux est toutefois bien supérieure à celle des matériaux paramagnétiques ($\chi \sim 1$ voire $\chi > 1$). La saturation est par conséquent atteinte pour un champ d'excitation de faible intensité. Les nanoparticules les plus couramment utilisées en biologie sont des nanoparticules superparamagnétiques à base d'oxydes de fer (notamment la magnétite Fe_3O_4 et la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

III-1-2-2. La Force magnétique

La force de magnétophorèse \vec{F}_{mag} s'exerçant sur une particule de susceptibilité χ et de volume V_p située dans l'air et placée dans un champ d'excitation \vec{H}_0 tel que $\vec{B}_0 = \mu_0 \vec{H}_0$ s'exprime par :

$$\vec{F}_{mag} = \frac{1}{\mu_0} V_p \chi (\vec{B}_0 \cdot \nabla) \vec{B}_0 = \frac{V_p \chi}{2\mu_0} \nabla B_0^2 \quad (1)$$

Cette expression est valable dans le cas d'une particule paramagnétique ou diamagnétique et si la taille de la particule est suffisamment petite pour pouvoir négliger la variation de B_0 sur son volume. Selon l'équation (1), la force magnétique dépend de l'induction magnétique B_0 (également appelée densité de flux magnétique et exprimée en Tesla (T)) ainsi que du gradient de champ magnétique (∇B_0) qui traduit la variation spatiale du champ (exprimé en T/m). On constate que si $\nabla B_0 = 0$ (champ uniforme), la particule n'est soumise à aucune force et qu'*a contrario* plus la variation spatiale du champ est grande, plus la force est importante (cf. figure I-14).

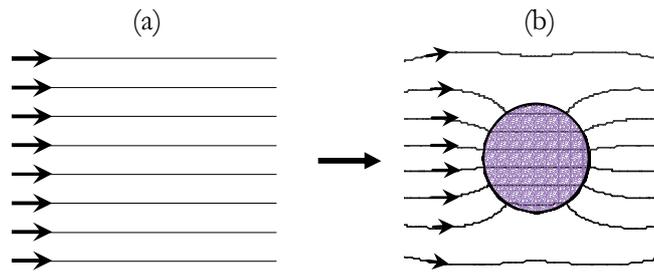


Figure I-13. a) Lignes de champ dans le cas d'un champ uniforme b) Concentration des lignes de champ dans un matériau ferromagnétique.

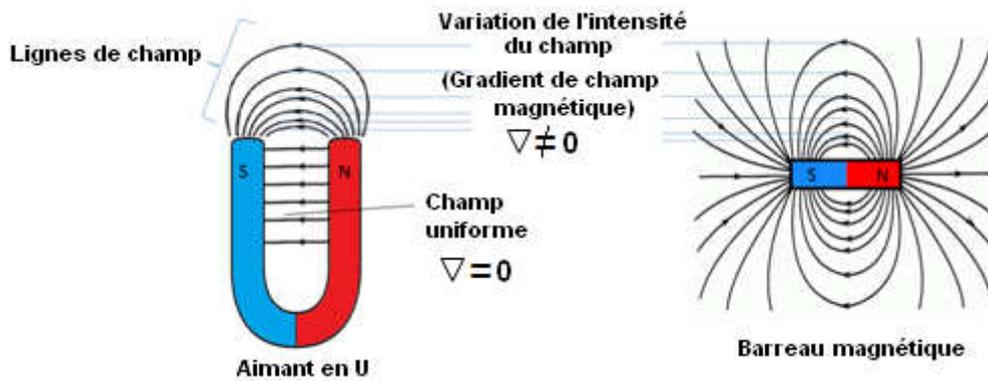


Figure I-14. Représentation des lignes de champs obtenues avec deux géométries d'aimants. (a) Aimant en « U » ; (b) barreau aimanté.

Le gradient de champ est un vecteur orienté dans le sens des intensités de champ croissantes. Ainsi, d'après (1), si $\chi < 0$, la force est orientée à l'opposé du gradient de champ. Ceci implique qu'un corps diamagnétique dans l'air est repoussé de la source de champ, déplacé vers les régions de plus faible intensité de champ magnétique et traduit le fait qu'il a acquis une aimantation opposée au champ magnétique d'excitation (cf. figure I-15a). En revanche, un corps paramagnétique ($\chi > 0$), aimanté dans le sens du champ, sera dirigé dans le sens du gradient, vers les zones de champ plus intense (cf. figure I-15b).

III-1-2-3. Cas d'une particule immergée dans un liquide

Lorsque la particule est immergée dans un milieu autre que l'air (cas d'une cellule dans un tampon utilisé en biologie), il convient de modifier l'équation (1) pour faire apparaître le contraste $\Delta\chi$ entre les susceptibilités magnétiques de la particule (χ_p) et de son milieu environnant (χ_m) :

$$\vec{F}_{mag} = \frac{V_p(\chi_p - \chi_m)}{2\mu_0} \nabla B_0^2 \quad (2)$$

Si ce contraste est insuffisant, la force magnétique obtenue sera insuffisante pour induire un mouvement. Les cellules ont une susceptibilité magnétique proche de celle de l'eau ($\sim -9.10^{-6}$). Dans un tampon biologique classique, $\Delta\chi$ est donc proche de 0. Aussi, en présence d'un champ d'excitation, la force magnétique exercée sur des cellules dans un milieu biologique est négligeable.

Le contraste de susceptibilité peut alors être augmenté, en plaçant par exemple les cellules dans un milieu enrichi en ions paramagnétiques tels que le gadolinium (Gd^{3+}). La valeur absolue du terme $\Delta\chi$ augmente (celui-ci étant négatif), ce qui induit une force de répulsion sur les cellules permettant de les confiner dans des « pièges magnétiques », voire de permettre leur lévitation. Cette lévitation diamagnétique a notamment été mise en évidence par Kauffmann *et al.*¹⁵⁹ sur des cellules Jurkat immergées dans un milieu enrichi en agent de contraste Gd-HP-DO3A, ainsi qu'au laboratoire Ampère sur des levures placées dans un milieu contenant du Gd-DTPA¹⁶⁰.

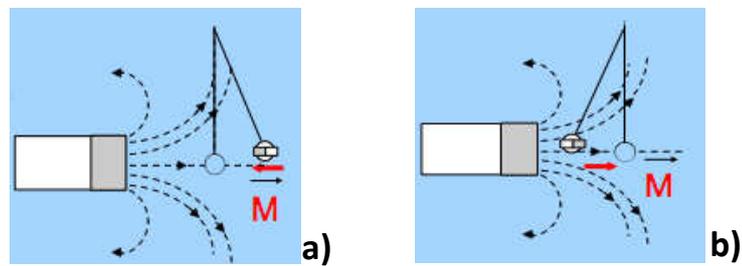


Figure I-15. a) Un corps diamagnétique dans l'air a tendance à être repoussé vers les faibles intensités de champ. b) Un corps paramagnétique est dirigé vers les zones de densité de flux magnétique élevée.

Cependant, il est beaucoup plus courant d'exploiter les forces d'attraction magnétique dans les applications de séparation cellulaire. Le terme $\Delta\chi$ est dans ce cas positif, et l'obtention d'une force efficace suppose que les cellules soient dotées de caractéristiques magnétiques qui les distinguent suffisamment de leur milieu d'immersion ($\chi_p \gg -9.10^{-6}$). Il existe dans la nature peu de types cellulaires possédant de telles propriétés. On peut citer toutefois les bactéries magnétotactiques, telles que la bactérie *Magnetospirillum magnetotacticum*, capable d'élaborer des chaînes de nanocristaux d'oxyde de fer (magnétosomes) et de s'orienter suivant le champ magnétique terrestre. D'autre part, l'hémoglobine présente dans les globules rouges est paramagnétique à l'état désoxygéné, ce qui les distingue des autres cellules du sang et leur confère des propriétés exploitables lors d'un tri magnétique¹⁶¹. Pour les autres cellules, un marquage magnétique est nécessaire. Typiquement, ce marquage sera mis en œuvre par l'intermédiaire de particules superparamagnétiques.

L'expression de la force s'exerçant sur une particule superparamagnétique dans un milieu liquide correspond à l'équation (2) si la particule est non saturée (soit pour de faibles champs d'excitation). Dans le cas contraire, l'aimantation n'est plus proportionnelle au champ appliqué et devient constante (M_{sat}). La force est alors proportionnelle au gradient de B, plutôt qu'à celui de B^2 :

$$F = M_{sat}V_p\nabla B \quad (3)$$

Dans tous les cas, on constate que l'emploi de gradients de champs importants s'avère nécessaire pour générer des forces significatives.

III-1-2-4. Les particules magnétiques

Les particules magnétiques utilisées en microbiologie sont généralement composées d'un noyau d'oxyde de fer (de magnétite, Fe_3O_4 ou de maghémite, $\gamma-Fe_2O_3$) enrobé d'une coque protectrice recouverte de ligands (molécules biologiques telles que : anticorps, biotine, streptavidine) ou de groupements fonctionnels chimiques qui leur conféreront des propriétés leur permettant de se fixer aux cellules (cf. figure I-16).

Il est possible d'utiliser des particules de différents ordres de grandeur pour le tri cellulaire. On distinguera les microparticules (dont le diamètre est supérieur à 1 μm) des nanoparticules. Ces dernières sont généralement divisées en 2 catégories : les *SPIO* (Small Particles of Iron Oxide) dont le diamètre global est supérieur à 50 nm et les *USPIO* (Ultrasmall Particles of Iron Oxide) dont le diamètre se situe entre 10 et 50 nm.

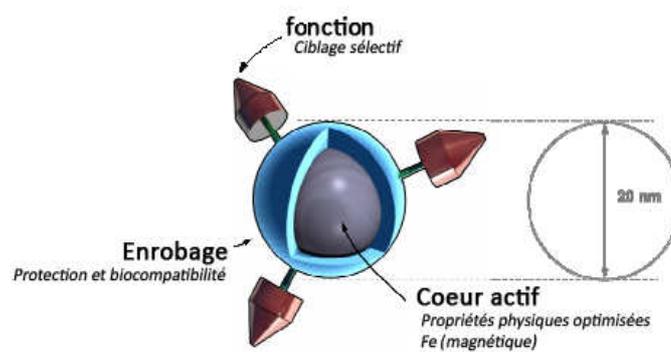


Figure I-16. Schéma de la structure d'une nanoparticule

Il existe dans le commerce une grande variété de tailles et de fonctions disponibles. Il faut toutefois noter que les particules de très petite taille (<50 nm) n'ont fait leur apparition sur le marché que très récemment. De nombreuses techniques de synthèse et de fonctionnalisation sont également décrites dans la littérature¹⁶² et de nombreux efforts de recherche sont actuellement développés pour permettre la synthèse de nanoparticules hybrides, possédant à la fois des propriétés magnétiques et de fluorescence. Il est également possible d'effectuer la biosynthèse contrôlée de nanoparticules superparamagnétiques dans des micro-algues¹⁶³ ou des bactéries magnétotactiques¹⁶⁴.

Si micro- ou nano- particules peuvent être utilisées pour des applications microbiologiques, on aura généralement tendance à apprécier davantage l'usage des « petites » particules. D'abord, parce que leur surface spécifique est beaucoup plus importante. Leurs capacités réactionnelles seront ainsi nettement améliorées. De plus, contrairement aux microparticules, les nanoparticules ne sédimentent pas. Le mouvement brownien garde le soluté magnétique en suspension colloïdale sans agitation. Enfin, les microparticules auront tendance à former des « cages » entourant les cellules marquées. Dans ces conditions, et particulièrement si l'on souhaite effectuer des observations microscopiques ou atteindre la surface de la cellule après séparation, ces particules magnétiques vont devoir être retirées en déstabilisant les liaisons établies par des conditions chimiques ou thermiques pouvant porter atteinte à l'intégrité des cellules.

Toutefois, il convient de noter que malgré les avantages offerts par les nanoparticules, leur emploi aura un impact sur la capacité d'attraction des cellules. En effet, d'après l'équation (3), la force s'exerçant sur une particule magnétique est proportionnelle au volume V_p de cette dernière. Cependant, une manière d'agir sur des particules de petite taille consiste à miniaturiser les sources de champ (ex : aimants) afin d'augmenter significativement le gradient de champ magnétique. En effet, lors de la réduction de la taille de l'aimant d'un facteur k , la valeur de l'induction reste inchangée, alors que son gradient augmente d'un facteur k . A titre d'illustration, si B subit la même variation sur 1 mm ou 10 μm , le gradient de B sera 100 fois plus grand dans le deuxième cas (cf. figure I-17).

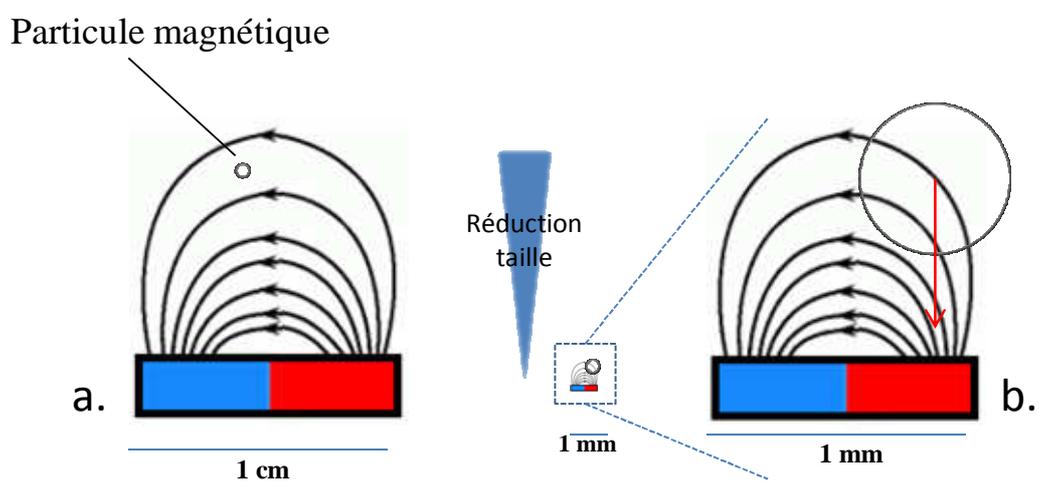


Figure I-17. Réduction d'échelle. a) A l'échelle de la particule, la variation spatiale du champ magnétique est peu perceptible. La force résultante est faible b) la réduction de taille de l'aimant produit un gradient de champ suffisant pour engendrer une force significative sur la particule.

III-1-3. *Procédures de séparation magnétique conventionnelles*

III-1-3-1. *Les macro-aimants*

La séparation magnétique de cellules marquées avec des microparticules (ou avec des nanoparticules de plusieurs centaines de nm) peut être effectuée à partir d'aimants ou d'électro-aimants macroscopiques standards en plaçant ces derniers devant la paroi du tube contenant le mélange cellulaire. Les cellules marquées attirées vers l'aimant se concentrent contre la paroi et le surnageant contenant les cellules non marquées est prélevé. Enfin, lorsque le tube est éloigné de l'aimant, les cellules cibles sont remises en suspension (cf. figure I-18).

Invitrogen® commercialise ainsi des kits de séparation incluant des portoirs magnétiques (DynaMag) dans lesquels peuvent se loger des tubes de différents formats (eppendorf, falcon, etc.), ainsi qu'une très grande variété de billes magnétiques de taille micrométrique (Dynabeads) fonctionnalisées avec des anticorps, des protéines, etc.

Cependant, l'utilisation de particules plus petites (en général à partir de 50 nm) requiert l'emploi de sources magnétiques plus élaborées développant des gradients de champ (∇B) beaucoup plus importants. C'est dans cet objectif que la société Miltenyi Biotech a développé le système MACS® (pour Magnetic Activated Cell Sorting), l'un des systèmes de tri les plus largement utilisés¹⁶⁵.

III-1-3-2. *Le système MACS® :*

Pour produire de forts gradients de champ, le système MACS utilise une colonne remplie de billes de fer de quelques millimètres de diamètre (cf. figure I-19a). Lorsque la colonne est placée dans un champ magnétique externe (produit par un macro-aimant), ces billes de fer concentrent les lignes de champ et induisent ainsi des variations de champ significatives à l'échelle des nanoparticules magnétiques de 50 nm (également commercialisées par Miltenyi).

Les échantillons cellulaires sont déposés en haut de la colonne, passent au travers des billes de fer aimantées formant une sorte de « filtre magnétique » retenant les cellules marquées. Les cellules non marquées traversent la colonne. Une fois le champ magnétique extérieur retiré, les cellules marquées sont récupérées par élution (cf. figure I-19b).

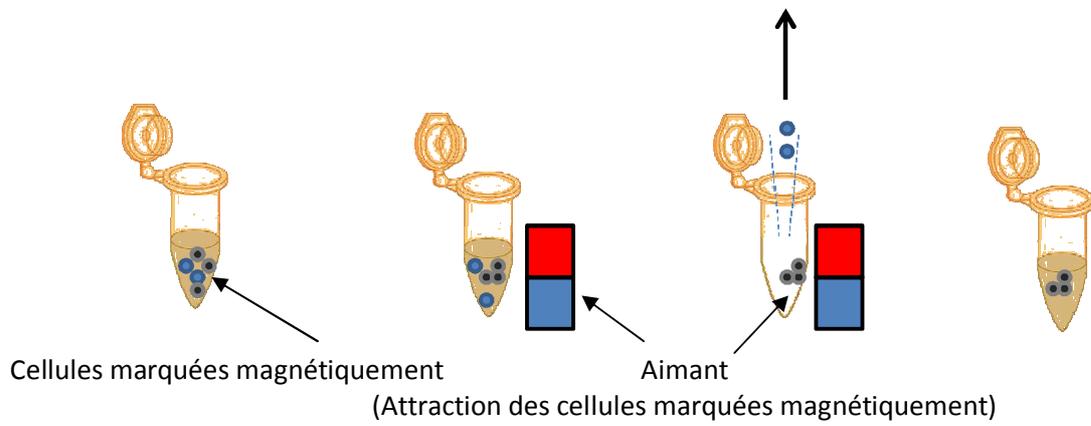


Figure I-18. Séparation magnétique conventionnelle (macro-aimants).

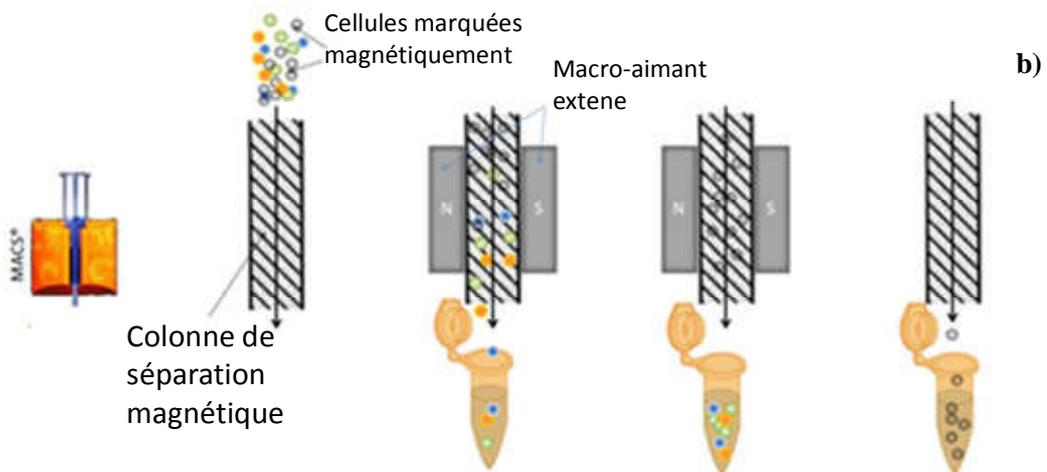


Figure I-19. a) Photographie des colonnes MACS® contenant à l'intérieur des billes de fer ; b) Principe général de la séparation par MACS®.

III-1-3-3. Apports et limites de la séparation magnétique conventionnelle

Combiné à l'immunomarquage, ce type de tri magnétique s'est révélé efficace pour la détection et l'isolement de pathogènes bactériens en microbiologie alimentaire, clinique et environnementale¹⁶⁶.

Des études montrent également que l'isolement magnétique de bactéries peut permettre d'accéder à l'information génomique de bactéries non cultivées^{138,113}. Pernthaler *et al.*¹⁴⁰ ont notamment employé récemment cette méthode pour réaliser une étude très complète du système de fonctionnement de l'oxydation anaérobie du méthane par un groupe d'archées non cultivables présentes dans des sédiments. En ciblant une zone caractéristique de l'ARN 16S de ces archées, la réalisation d'un magnéto-FISH a non seulement permis d'isoler les cellules d'intérêt, mais également d'extraire avec elles les partenaires syntrophiques bactériens qui leur sont physiquement associés. Ceci a permis la compréhension de la communication intercellulaire établie entre les différents partenaires microbiens, alors qu'un séquençage métagénomique de la communauté microbienne entière n'aurait mis en lumière que quelques fonctions potentielles isolées concernant ce processus d'oxydation du méthane.

La séparation magnétique à partir de macro-aimants conventionnels est une procédure désormais éprouvée en microbiologie pour isoler au sein d'un échantillon cellulaire complexe, une population bactérienne d'intérêt. Le processus de séparation est simple, rapide et offre l'avantage de pouvoir trier un grand nombre de cellules cibles en même temps pour un coût relativement faible (par rapport au FACS). Il repose parfois sur l'utilisation de microparticules pouvant être encombrantes et limiter l'étude. Le système MACS® offre toutefois l'avantage de pouvoir agir sur des particules de taille nanométrique.

III-2. Systèmes de tri miniaturisés

Les méthodes conventionnelles de tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) ou par magnétisme (MACS) présentent globalement des performances satisfaisantes mais montrent cependant certaines limitations pouvant restreindre leur utilisation. Le FACS reste un équipement coûteux et complexe à manipuler. Les gradients de champs obtenus avec les trieurs magnétiques standards sont encore très inférieurs à ceux pouvant être générés à l'échelle micrométrique en intégrant les sources de champ. Par ailleurs, si le MACS s'avère être un instrument adapté à la manipulation collective d'un ensemble de cellules, il ne permet pas d'envisager un traitement individuel de chacune d'entre elles. Le besoin croissant d'optimisation des systèmes de tri cellulaire a cependant amené les chercheurs à développer de nouveaux outils, moins coûteux et surtout plus performants. Dans ce contexte, les systèmes de tri microfluidique ouvrent des perspectives extrêmement prometteuses. La miniaturisation technologique offre en effet la possibilité de créer des outils dont les dimensions caractéristiques sont en adéquation avec la taille des cellules et permettant l'intégration de fonctions dédiées au transport de cellules et de fluides.

Les avantages associés à la miniaturisation des systèmes d'étude du vivant incluent la réduction de la taille des équipements, la rapidité d'analyse et les faibles temps de réaction, la possibilité de conduire de multiples opérations en parallèle et celle d'aboutir à des dispositifs portables et peu coûteux, potentiellement jetables. La microfluidique offre par ailleurs la possibilité de travailler avec de faibles volumes d'échantillons et de réactifs et de tirer parti des comportements laminaires des écoulements aux petites dimensions¹⁶⁷. Au-delà de la transposition à l'échelle micrométrique du processus de tri, les procédés de microfabrication vont aussi permettre l'intégration au sein d'une même puce des étapes amont de préparation de l'échantillon ou aval de post-traitement. On peut ainsi envisager l'ajout de fonctions d'analyses chimiques, de lyse bactérienne, de PCR, etc. et réaliser dans un seul dispositif différentes opérations habituellement conduites en laboratoire, ce qui correspond au concept de « laboratoire sur puce ».

Compte-tenu des avantages listés ci-dessus, de nombreuses recherches se sont portées sur le développement de dispositifs microfluidiques de tri. Dans la section suivante, nous évoquerons brièvement les microsystèmes reprenant le principe du FACS, avant de nous intéresser plus spécifiquement aux dispositifs permettant la manipulation de cellules par champ magnétique.

III-2-1. *Micro-trieurs de cellules fluorescentes : les micro-FACS*

Les micro-trieurs de cellules fluorescentes (μ FACS) reposent sur l'emploi de la microfluidique combinée à plusieurs méthodes passives ou actives permettant i) de focaliser les cellules en entrée du dispositif afin de les acheminer les unes à la suite des autres vers la zone de détection ii) de détecter la présence des cellules et analyser leurs caractéristiques iii) d'aiguiller les cellules vers des sorties indépendantes en fonction des critères de tri fixés par l'utilisateur.

Le premier microsystème de tri de cellules fluorescentes a été mis au point par l'équipe de Quake (1999)¹⁶⁸. Ce dispositif (cf. figure I-20) comporte un réseau de canaux microfluidiques en forme de « T » fabriqué à partir d'un élastomère de silicone. Le flux est contrôlé par champ électrique (principe d'électro-osmose) grâce à des électrodes connectées au niveau des entrées et sorties. La puce est montée sur un microscope optique inversé dont l'objectif focalise un laser quelques μm en-dessous de la jonction du « T » où le tri va s'effectuer. Les signaux de fluorescence émis au passage des cellules sont détectés puis convertis en signaux électriques avant d'être traités par un ordinateur. En fonction du signal détecté, les tensions appliquées aux électrodes sont modifiées afin d'assurer l'aiguillage électro-osmotique des cellules vers la sortie adéquate. Des cellules d'*E. coli* exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) ont été isolées à partir d'un échantillon contenant également des cellules non-fluorescentes, avec un enrichissement de 30 fois la concentration initiale et un débit de 20 cellules / s.

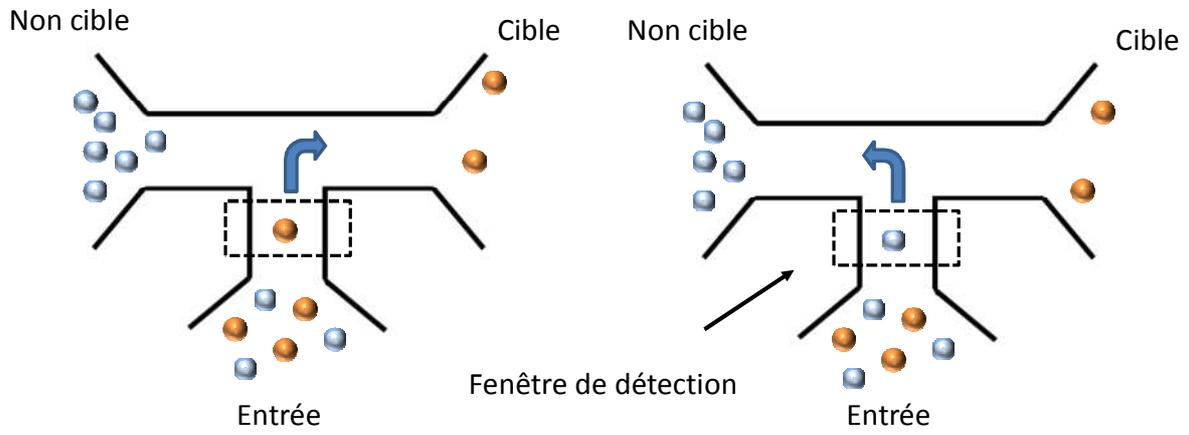


Figure I-20. Représentation schématique du principe d'un micro-FACS.

Les développements suivants se sont ensuite concentrés sur l'amélioration de l'intégration et des vitesses de tri. Diverses solutions, basées sur l'emploi de forces diélectrophorétiques, acoustiques ou hydrodynamiques ont été envisagées pour assurer la focalisation cellulaire en entrée du dispositif^{169,170,171}, ainsi que l'aiguillage des cellules en sortie¹⁷². La miniaturisation des composants optiques, qui s'avère encore délicate, fait également l'objet de nombreux travaux^{173,174}. Des articles de synthèse très complets décrivent de manière approfondie les développements technologiques effectués ces dernières années autour des μ FACS^{175,176}.

Un certain nombre de μ FACS ont été décrits à ce jour^{177,178,179,180}. Les bénéfices apportés par la miniaturisation résident dans la réduction considérable des coûts et de la complexité, ce qui permet d'envisager le fonctionnement en parallèle de nombreux dispositifs. D'autre part, le fait d'opérer en système fermé permet de réduire largement le risque de contamination lors du tri de cellules pathogènes.

Quoique prometteurs, ces dispositifs offrent toutefois encore des débits limités par comparaison aux équipements commerciaux et présentent les mêmes inconvénients que ces derniers pour une application en microbiologie environnementale, par exemple l'autofluorescence de phases minérales et organiques pouvant nuire à l'efficacité du tri^{181,182}.

III-2-2. *Les micro-trieurs de cellules magnétiques*

Le tri magnétique en système microfluidique peut être réalisé en plaçant des macro-aimants conventionnels (aimants permanents¹⁸³ ou électroaimants¹⁸⁴) à côté d'un microcanal dans lequel circulent les cellules (cf. figure I-21). Cette méthode est simple et rapide. Cependant, comme évoqué précédemment, les gradients de champ magnétique développés par les macro-aimants peuvent s'avérer insuffisants pour attirer des bactéries marquées avec des nanoparticules de petite taille. Une deuxième approche va donc consister à intégrer les sources de champ magnétique.

III-2-1. *Intégration de sources de champ magnétique en microfluidique*

On distingue trois types de sources intégrables: i) les micro-bobines ou encore micro-électroaimants qui seront commandés électriquement ii) les matériaux ferromagnétiques micro-structurés qui seront aimantés par un macro-aimant externe et iii) les micro-aimants permanents.

III-2-1-1. *Les micro-électroaimants intégrés*

Un électroaimant intégré est constitué d'une piste conductrice, (cuivre, or, aluminium) créant un champ magnétique lorsqu'elle est parcourue par un courant. Plusieurs structures peuvent être employées, telles que de simples pistes ou des bobines à enroulement plan¹⁸⁵(cf. figure I-22). Le micro-électroaimant peut également être couplé à un matériau magnétique doux afin d'accroître l'intensité du champ magnétique. Smistrup *et al*¹⁸⁶. ont ainsi réalisé sur une face d'un wafer en silicium des microbobines planaires semi-encapsulées dans une structure en nickel, générant un champ magnétique dans un canal microfluidique gravé sur l'autre face. Ils ont montré qu'il était possible d'employer ces sources de champ pour piéger et relâcher des particules magnétiques en flux continu.

Les principaux avantages des micro-électroaimants tiennent au fait qu'ils sont facilement intégrables et qu'il est possible avec ce type de sources de moduler le champ. Les objets attirés peuvent être détachés facilement du support après le tri. Lee *et al.*¹⁸⁷ ont obtenu des cartographies de champ modulables en contrôlant de manière indépendante les courants injectés dans différents conducteurs formant une matrice (cf. figure I-23). Les micro-objets magnétiques piégés peuvent ainsi se déplacer en suivant la position du maximum de champ magnétique. Certaines structures d'électroaimants peuvent permettre l'isolement de cellules uniques. Dans la même étude, les mêmes auteurs, ont positionné de manière individuelle des bactéries magnétotactiques au centre d'une simple spire de diamètre 5 μm (cf. figure I-24). L'utilisation d'électroaimants peut s'avérer utile lorsque l'intensité du champ doit être contrôlée. Toutefois, les champs générés par ces aimants restent limités en intensité¹⁸⁸. De plus, le courant circulant dans les électroaimants induit généralement des échauffements par effet Joule, ce qui peut porter atteinte à la viabilité cellulaire.

III-2-1-2. *Les matériaux ferromagnétiques micro-structurés*

Une autre approche permettant d'obtenir des gradients de champs contrôlés et importants dans des dispositifs microfluidiques consiste à micro-structurer des matériaux ferromagnétiques doux placés en fond de canal et de placer une source magnétique externe à proximité de ces structures pour les aimanter. Lorsque la source est éloignée (ou éteinte dans le cas d'électroaimants), les plots de matériaux doux se désaimantent, ce qui permet de récupérer les objets attirés (figure I-25).

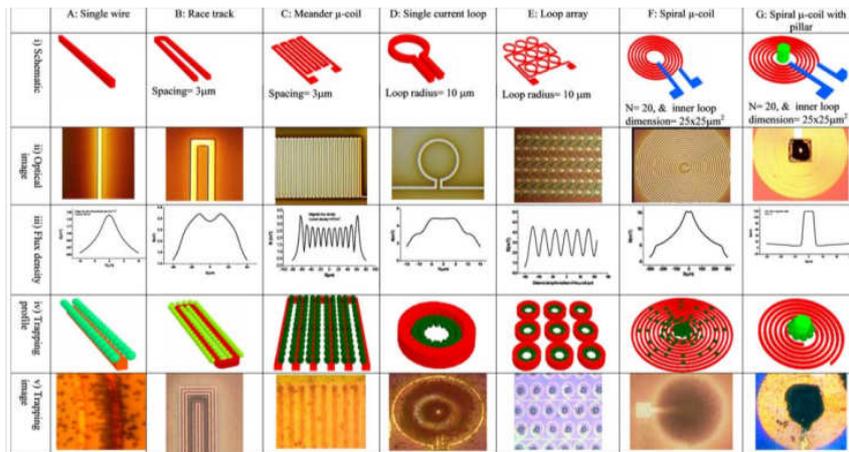


Figure I-21. Illustration de quelques micro-électroaimants

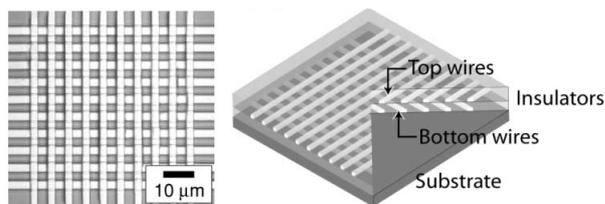


Figure I-22. Matrice de micro-électroaimants déposés sur un substrat. Chaque conducteur de la matrice est relié à une source de courant séparée qui peut être commandée individuellement par un ordinateur.

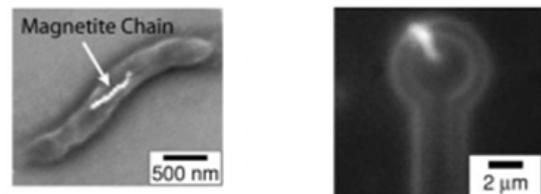


Figure I-23. (a) Image d'une bactérie magnétotactique. (b) Positionnement individuel d'une bactérie magnétotactique avec un micro-électroaimant.

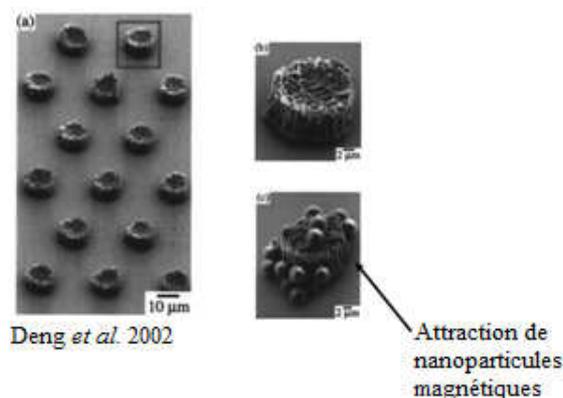


Figure I-24. Images MEB (microscopie électronique à balayage) de matériaux ferromagnétiques micro-structurés (plots de nickel).¹⁸⁹

III-2-1-3. *Les micro-aimants permanents*

Les récentes avancées technologiques effectuées en matière de dépôt et de structuration de couches d'aimants de bonne qualité, notamment à l'Institut Néel à Grenoble, ont permis la réalisation de micro-aimants permanents très performants, qui ont été employés pour étudier la lévitation diamagnétique de cellules (partenariat G2Elab/Institut Néel/CEA biopuces, thèse de Paul Kauffmann)¹⁹⁰.

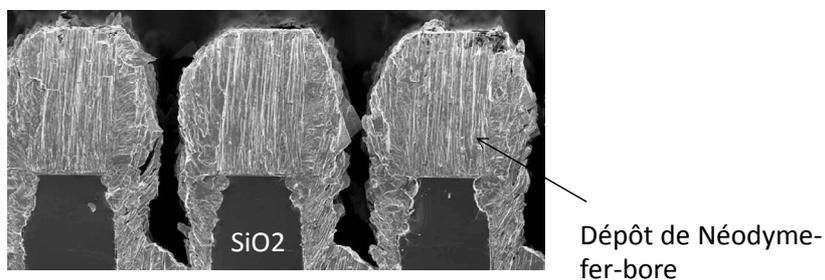
Les micro-aimants permanents peuvent être fabriqués en réalisant des dépôts d'alliages de matériaux ferromagnétiques durs type terres rares (ex : Néodyme-Fer-Bore (NdFeB) ou Samarium Cobalt (SmCo)) sur un substrat de silicium micro-structuré (figure I-26).

Une autre approche consiste à utiliser la technique de Thermomagnetic Patterning¹⁹¹ pour structurer le film magnétique et aboutir ainsi à un réseau de microaimants parfaitement plan, ce qui facilite l'intégration microfluidique. Cette technologie, mise au point à l'Institut Néel¹⁹¹ a été celle retenue dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit et sera donc détaillée plus en détail au chapitre suivant.

Les micro-aimants permanents peuvent atteindre des dimensions caractéristiques de quelques micromètres seulement (jusqu'à 7 μ m de côté pour certains microaimants utilisés dans nos expériences) et développer par conséquent des gradients de champs magnétiques extrêmement importants^{192,190}, tout en présentant des qualités (courbe d'aimantation) équivalentes à celles des meilleurs aimants macroscopiques disponibles dans le commerce. De plus, ils permettent de générer des champs magnétiques de manière totalement autonome, sans adjonction d'une source externe. Toutefois leur processus de fabrication est complexe et les champs obtenus ne sont pas modulables (nous verrons cependant au chapitre suivant que le pouvoir d'attraction de ces aimants peut être ajusté par le biais de la technique d'intégration microfluidique employée).

III-1. *Séparation magnétique en système microfluidique*

Pamme *et al.* ont présenté en 2004 l'un des premiers exemples de séparation magnétique en système microfluidique¹⁹³. En appliquant un champ magnétique perpendiculaire à la direction d'écoulement du fluide, il est possible de répartir des particules magnétiques de différentes tailles ou susceptibilités magnétiques dans la largeur du canal et de les dévier ainsi vers différentes sorties en exploitant la nature laminaire du flux. Cette méthode porte le nom de « free-flow magnetophoresis » (cf. figure I-27).



Thèse Paul Kauffman

Figure I-25. Image MEB de micro-aimants permanents¹⁹⁰.

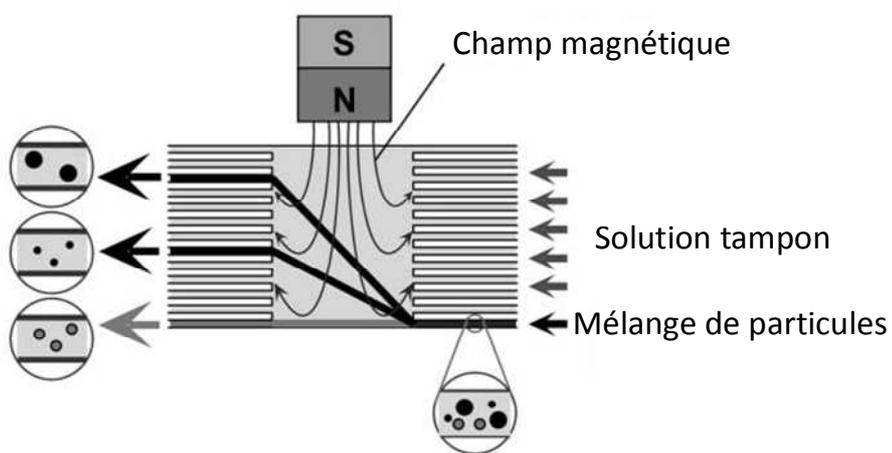


Figure I-26. Principe du « Free-flow magnetophoresis »

Dans un article de Deng *et al.*¹⁸⁹, des plots de nickel de 15 μm de diamètre ont été intégrés dans un dispositif microfluidique puis aimantés par une source externe. L'efficacité du dispositif a été démontrée en séparant des particules magnétiques de diamètre 4,5 μm et non magnétiques de 6 μm . Toutes les particules non magnétiques ont pu être collectées dans le premier éluat où aucune bille magnétique n'a été détectée. Lors du retrait de la source d'excitation magnétique, plus de 95 % de billes magnétiques ont été récupérées (concentration initiale 10^4 particules/ml). Cette solution permet de moduler le champ en employant un électroaimant ou un aimant que l'on déplace. En revanche, le système obtenu n'est pas autonome, dans la mesure où la présence de la source externe est nécessaire.

Inglis *et al.* ont employé quant à eux des bandes de matériaux ferromagnétiques doux (nickel) placées en fond de canal et formant un angle de 10° avec la direction d'écoulement du fluide¹⁹⁴. Dans cet exemple, les structures magnétiques sont aimantées à l'aide d'un champ externe de 0.08 T, permettant d'obtenir un gradient de champ maximum estimé à 5000 T/m. Les cellules marquées magnétiquement sont attirées vers les bandes de Nickel et subissent ainsi une légère déviation par rapport à la direction du flux, tandis que la trajectoire initiale des cellules non marquées n'est pas altérée.

Une version plus sophistiquée de ce type de structure a été décrite par Jonathan Adams *et al.*¹⁹⁵ et employée pour séparer trois sous-types de *Escherichia coli* MC1061, d'eux d'entre eux étant marqués par des particules magnétiques présentant des aimantations à saturation et des tailles différentes ($\varnothing 2,8 \mu\text{m}$ et $\varnothing 4,5 \mu\text{m}$). Tandis que les bactéries non marquées sont acheminées directement vers la sortie du canal, les deux autres cibles bactériennes, portant des charges magnétiques distinctes, sont déviées vers deux sorties différentes, grâce à deux jeux de bandes ferromagnétiques orientées différemment (figure I-27). Ces chercheurs démontrent que même avec de faibles concentrations de cellules cibles (< 0,4 %) il est possible d'enrichir simultanément et en fractions purifiées chaque type de cellules cibles à plus de 90 % avec un débit de 10^9 cellules par heure. Une autre approche originale a été proposée par l'équipe de Viovy à l'Institut Curie. Elle consiste à employer des colonnes de billes superparamagnétiques fonctionnalisées avec des anticorps et auto-organisées sur un réseau de pièges magnétiques préparés par microtamponnage d'un ferrofluide (« encre magnétique ») pour permettre une attraction efficace dans tout le volume. Ce dispositif est notamment employé pour l'isolement de cellules tumorales circulantes (CTC) présentes en très faible quantité dans le sang¹⁹⁶.

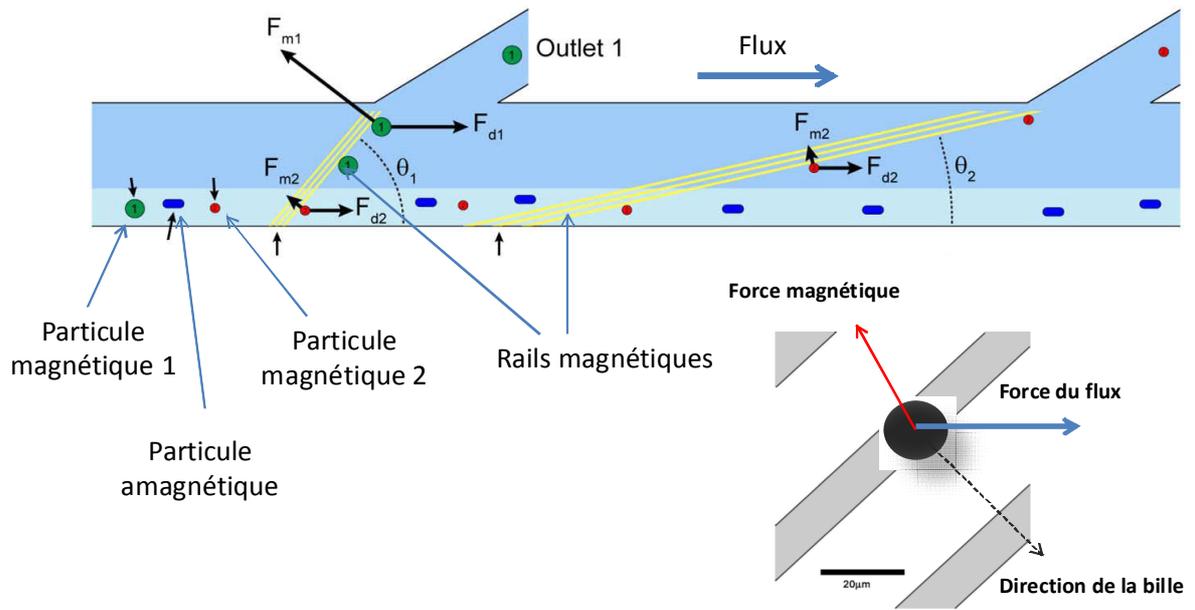


Figure I-27. Principe de séparation magnétique différentielle par rail magnétique

CONCLUSIONS

Dans ce chapitre nous avons présenté les différentes méthodes de tri cellulaire requérant au préalable un marquage spécifique (taxonomique et fonctionnel) aboutissant à une reconnaissance fluorescente ou magnétique des cellules bactériennes. Un aperçu d'un type de marquage particulier, établi par l'expression de gènes marqueurs fluorescents et destiné à étudier l'acquisition de gènes par transfert horizontal, a également été présenté. Il sera comparé dans la suite du manuscrit avec la technique retenue, consistant à marquer magnétiquement des cellules bactériennes ayant acquis un gène au cours de processus d'échanges génétiques.

En abordant avantages et limites de chacune des techniques de marquage, certains points importants ont été relevés. Ainsi, si l'immunomarquage est potentiellement la technique la plus rapide et efficace et qui de plus maintient les cellules dans un état de viabilité à la suite du marquage, la nécessité d'avoir une culture bactérienne pure pour l'élaboration d'anticorps spécifiques en limite généralement son développement. A l'inverse, la méthode d'hybridation *in situ* nécessite une étape de fixation cellulaire ne maintenant pas la viabilité de ces dernières mais ne nécessite pas de culture pure préalable et peut par conséquent *a priori* concerner une partie importante des cellules non cultivables de l'environnement.

A l'issue des différents marquages établis, deux catégories de technologies de tri peuvent ensuite être utilisées : conventionnelles à l'échelle macroscopique ou en système miniaturisé. Nous avons vu que si les premières (macro-aimants) étaient parfois très coûteuses (FACS®) ou inadaptées aux entités de petite taille, la seconde catégorie de technologies de tri étaient aujourd'hui en plein développement du fait des avantages inhérents à la miniaturisation : dispositifs portables, peu coûteux, à l'échelle des cellules, nécessitant de faibles volumes d'échantillons et potentiellement intégrables en « laboratoire sur puce ».

Le choix entre tri de cellules fluorescentes ou tri de cellules magnétiques va dépendre du domaine d'étude considéré. Dans des environnements terrestres (types sols ou sédiments), la présence de contaminants présents dans la matrice va nuire à l'efficacité des appareils de tri par fluorescence. L'autofluorescence naturelle de certains constituants pose également un certain nombre de problèmes auxquels il est difficile de remédier. A cet effet, le tri magnétique peut être préféré même si le bruit de fond que peuvent représenter des bactéries magnétotactiques naturelles mérite d'être étudié quoiqu'aucune étude à notre connaissance ne rapporte des problèmes particuliers liés à ces microorganismes. Le tri magnétique reste donc une méthode très avantageuse pour permettre un tri massif de cellules non contraint par les impuretés matricielles d'autant plus s'il se décline à échelle miniaturisée. Il permet le positionnement précis des cellules, parfois de manière individuelle, sur des surfaces. De plus, la réduction d'échelle étant très favorable aux forces magnétiques, l'emploi de micro-aimants permet l'obtention de forces considérables à petite échelle pouvant accroître la sensibilité de la détection.

Plusieurs dispositifs de tri intégrant des micro-sources de champ magnétique ont été développés à ce jour. Toutefois et à notre connaissance, aucune démonstration de tri de bactéries avec des micro-aimants permanents intégrés n'a été réalisée antérieurement aux travaux qui seront présentés ici. Les très forts gradients atteignables avec ces structures (jusqu'à 10^6 T/m), ainsi que les excellentes propriétés magnétiques de ces aimants (aimantation rémanente supérieure à 1 T) en font des outils particulièrement adaptés à la manipulation de particules de petite taille telles que les bactéries, même faiblement marquées comme nous allons le démontrer ici. Ces objectifs vont nécessiter la réalisation de micro-dispositifs basés sur l'intégration de micro-aimants permanents dans un canal microfluidique. Nous montrerons leur possible utilisation dans le cadre de travaux visant à piéger des cellules bactériennes, ce qui nécessitera leur marquage préalable par des nanoparticules magnétiques.

**CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT D'UN
MICROSYSTEME DE TRI MAGNETIQUE : INTEGRATION
D'UN RESEAU DE MICRO-AIMANTS PERMANENTS DANS UN
CANAL MICROFLUIDIQUE**

INTRODUCTION

Le tri cellulaire magnétique devient un procédé de plus en plus populaire dans les laboratoires de biologie pour isoler spécifiquement des cellules. Cette technique offre l'avantage d'être rapide, efficace et économique. D'autre part, elle permet d'extraire simultanément un très grand nombre de cellules ciblées à l'intérieur d'un échantillon.

Comme indiqué précédemment, les gradients de champs magnétiques générés par les aimants macroscopiques sont trop faibles pour permettre l'attraction de cellules marquées magnétiquement avec des nanoparticules de faible diamètre. Lorsque l'on souhaite utiliser ces dernières, qui présentent des avantages importants pour la biologie (cinétique d'interaction, capacité à ne pas modifier les propriétés optiques des cellules, absence de sédimentation¹⁹⁷), des dispositifs de séparation magnétique développant des gradients de champs magnétiques plus importants doivent être employés. Ainsi, le système MACS® permettant de générer des gradients de champs de l'ordre de 10^4 T/m¹⁶⁵ est aujourd'hui communément utilisé dans les applications de tri cellulaire^{138,198,199,200}. Cependant, du fait de l'intérêt suscité par les laboratoires sur puce et des effets bénéfiques de la réduction d'échelle sur les forces magnétiques, de nouveaux systèmes de tri magnétique en canal microfluidique voient le jour^{188, 194,186}, avec la perspective de pouvoir combiner le procédé de séparation avec les étapes amont de préparation de l'échantillon et aval d'analyse cellulaire (lyse, amplification PCR, séquençage, électrophorèse...) au sein d'un même dispositif mesurant seulement quelques centimètres^{201,202,203}. De plus, la miniaturisation des sources magnétiques permet le contrôle précis des forces s'exerçant sur les cellules, ce qui offre la possibilité par exemple de les positionner individuellement sur une surface magnétique micro-structurée¹⁸⁷. Cette approche permet d'envisager l'étude des processus cellulaires à l'échelle de la cellule unique (« single cell »), c'est-à-dire en tenant compte au maximum de la diversité existant au sein d'une population ou d'une communauté²⁰⁴.

L'intégration des sources de champ magnétique au sein d'un microsystème constitue cependant un réel défi technologique. Elle implique souvent un nombre important d'étapes de fabrication parfois longues et coûteuses¹⁸⁸. Dans le cadre d'un projet ANR intitulé « Emergent¹ », des sources de champ magnétique miniaturisées autonomes aisément intégrables en canal microfluidique ont été mises au point à L'Institut Néel de Grenoble², qui bénéficie d'un savoir-faire d'exception dans le dépôt et la structuration de films magnétiques de haute qualité. Les étapes de design des microaimants ont été menées conjointement avec le G2Elab³, notamment dans le cadre de la thèse de Luiz Fernando Zanini²⁰⁵.

¹ AAP Contaminants, Ecosystèmes, Santé

² Institut Néel CNRS/UJF UPR2940 25 rue des Martyrs BP166 38042 Grenoble cedex9

³ UMR 5269 INPG-UJF-CNRS 25 rue des Martyrs BP166 38042 Grenoble cedex9

Dans ce chapitre, dédié à la présentation de l'outil développé, nous aborderons la description des micro-aimants et présenterons quelques résultats démontrant leur efficacité pour la manipulation de divers micro-objets magnétiques. Nous présenterons ensuite le principe mis en œuvre pour permettre l'intégration de ces aimants dans un canal microfluidique.

I) LES MICRO-AIMANTS

I-1. *Concept et fabrication*

Les microaimants réalisés à l'Institut Néel sont fabriqués suivant un processus de structuration particulièrement novateur, le « Thermo-Magnetic Patterning » (TMP) qui permet d'obtenir des réseaux d'aimants plats permanents¹⁹¹.

Un film magnétique de Néodyme-Fer-Bore (NdFeB) est déposé par pulvérisation cathodique triode sur un wafer en silicium. Initialement, ce film d'épaisseur 5 μm est aimanté à saturation dans une direction. Des micro-motifs magnétiques de géométrie bien définie peuvent alors être obtenus à partir de ce film grâce à la technique TMP qui consiste à exploiter la dépendance de la coercitivité⁴ à la température pour inverser localement l'aimantation. Un masque est posé sur le film que l'on irradie pendant quelques nanosecondes à l'aide d'un laser pulsé.

Le laser sert ici à chauffer la couche magnétique sur certaines parties, correspondant aux ouvertures du masque. La coercitivité va ainsi diminuer localement dans les zones irradiées. Durant l'irradiation, un champ magnétique externe de direction opposée à la direction initiale d'aimantation du film de NdFeB est appliqué, ce qui va permettre de renverser localement l'aimantation au niveau des zones chauffées par le laser. On obtient ainsi une juxtaposition de zones d'aimantation opposée constituant un réseau de micro-aimants. Un schéma qui illustre ce processus est représenté figure II-1. Pour plus de détails sur le protocole de fabrication des micro-aimants, se référer fin à l'annexe I en fin de manuscrit ou à la référence¹⁹¹.

I-2. *Géométrie des micro-aimants*

La géométrie des micro-aimants dépend du masque apposé sur le film magnétique durant l'irradiation au laser. Dans la limite où la diffusion de la chaleur ne s'effectue pas de manière latérale sur la surface magnétique (ce qui va élargir le motif) mais uniquement en profondeur, tout type de géométrie de masque peut être utilisée (ex : bandes, cercles, damiers...). Pour nos expérimentations, les films magnétiques ont été irradiés à travers des masques portant soit des motifs en damier de 100 x 100 μm soit des motifs carrés de 7,5 x 7,5 μm (figure II-2).

⁴ Résistance intrinsèque à un champ magnétique externe

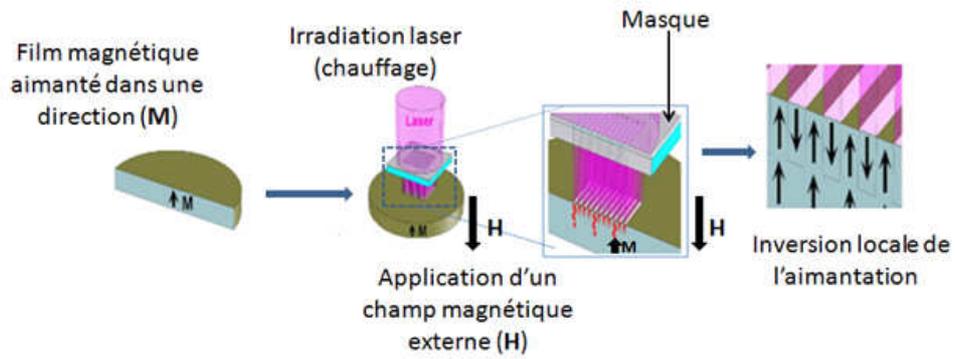


Figure II- 1.Schéma du processus de « Thermo-Magnetic Patterning¹⁹¹ »

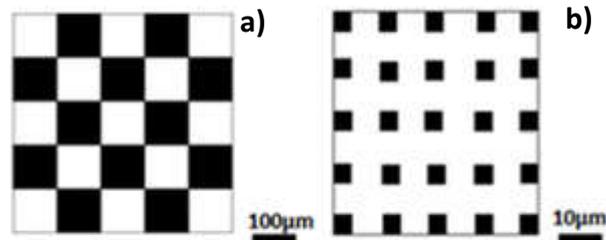


Figure II-2. Représentation schématique des masques utilisés au cours du processus de « Thermo-Magnetic Patterning ». (a) damier de 100 x 100 μm ; (b) réseau de motifs carrés de 7,5 x 7,5 μm .

I-3. *Observation des micro-aimants*

Les micro-aimants sont invisibles en conditions normales d'observation sous microscope. Ils ne présentent pas de variation de topologie (figure II-3a). Pour établir la carte des domaines magnétiques, il est cependant possible de recourir à l'imagerie magnéto-optique, exploitant l'effet Faraday. Pour cela, on plaque un film indicateur magnéto-optique (*MOIF*) à la surface du réseau de micro-aimants. Ce film (fourni par l'Institut Néel) est constitué d'une couche de ferrite-grenat (transparente) surmontant une couche de chrome réfléchissante. A la traversée du film, un faisceau de lumière blanche polarisée (grâce à un polariseur placé sur le microscope) subit une rotation d'un angle qui dépend de l'aimantation. L'analyseur placé sur le microscope recueille l'onde lumineuse après rotation et réflexion et permet de faire apparaître un contraste entre deux domaines voisins dont l'aimantation est dirigée dans des sens opposés.

II) CARACTERISTIQUES MAGNETIQUES DES MICRO-AIMANTS

II-1. *Densité de flux magnétique*

La figure II-4 montre les simulations de distribution spatiale du champ magnétique 1 μm au-dessus de la surface des micro-aimants obtenus avec le logiciel Comsol Multiphysics®. Celles-ci indiquent que les zones où le champ est maximal se situent à la frontière séparant deux régions d'aimantation opposée.

II-2. *Gradients de champ magnétique*

Les valeurs de gradient de champ magnétique générées ont été estimées à 2.10^5 T/m au niveau de la frontière séparant deux micro-aimants de direction d'aimantation opposée, 1 μm au-dessus de la surface²⁰⁶. Notons ici que la réduction d'échelle permet d'obtenir des gradients de champ considérables, au regard des valeurs obtenues avec des macro-aimants de NdFeB conventionnels, se situant généralement autour de quelques T/m à quelques dizaines de T/m¹⁶⁵. Notons également que les forts gradients de champs obtenus avec les micro-aimants sont absolument nécessaires pour constituer un réseau de pièges magnétiques capables d'attirer des particules de très petite taille, comme nous nous attacherons à le montrer dans la suite de ce chapitre.

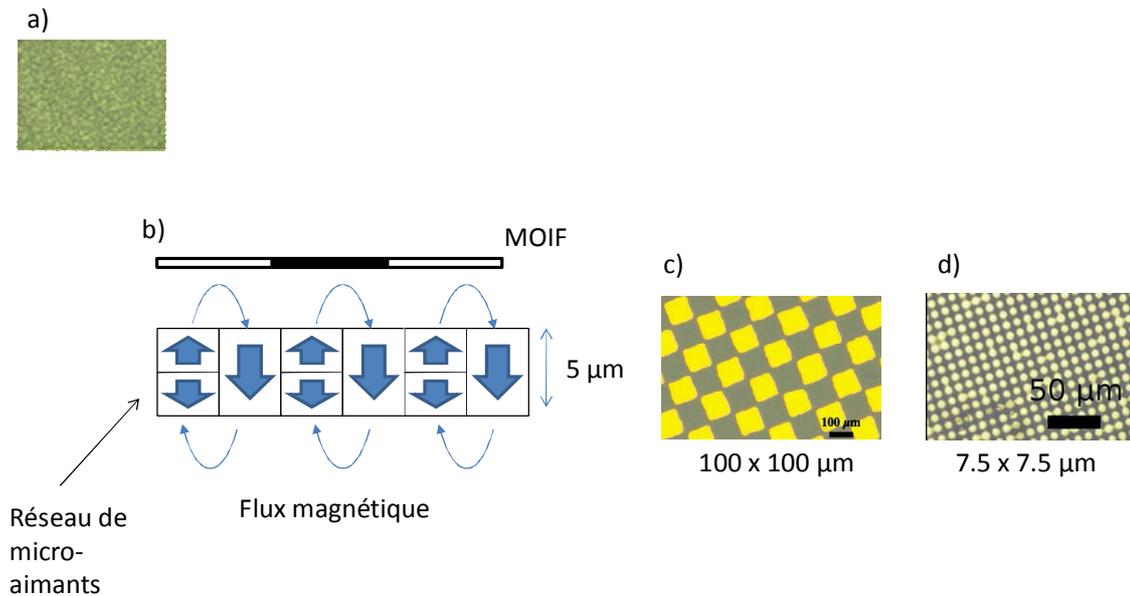


Figure II-3. a) photographie d'un réseau de micro-aimants plats observés au microscope ; b) représentation schématique du principe de la révélation magnéto-optique des domaines d'aimantations ; c) et d) images magnéto-optiques obtenues en plaçant un MOIF au dessus des réseaux de micro-aimants (respectivement 100 x 100 μm et 7,5 x 7,5 μm)

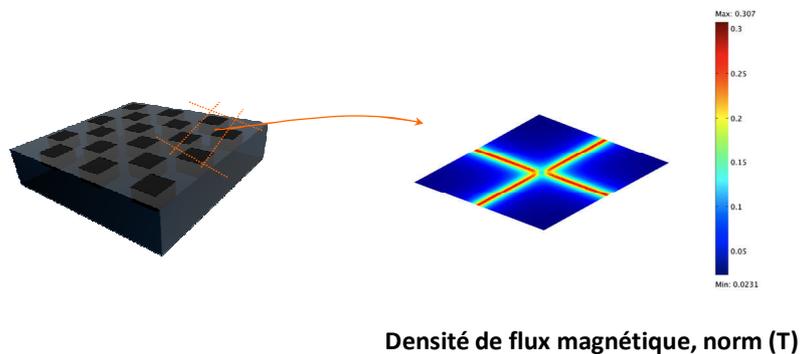


Figure II- 4. Norme de la densité de flux magnétique 1 μm au-dessus de la surface du film magnétique structuré (profondeur de retournement de l'aimantation considérée égale à 1.3 μm)

II-3. Capacité d'attraction des micro-aimants

Cette étape nous a permis de vérifier que les micro-aimants étaient capables d'attirer des entités magnétiques de très petite taille telles que des nanoparticules superparamagnétiques de 50nm de diamètre. Puis, l'attraction de particules biologiques marquées magnétiquement a été testée. Les liposomes, vésicules artificielles formées d'une bicouche lipidique, ont constitué dans un premier temps un bon modèle d'étude. Il est en effet possible d'encapsuler des nano-objets dans ces vésicules lors de leur synthèse par électroformation. L'interaction de liposomes renfermant des nanoparticules magnétiques de 100 nm avec la surface des micro-aimants a ainsi été étudiée. Des tests similaires ont été conduits sur des bactéries ayant internalisé des nanoparticules magnétiques de 100 nm par électroporation (formation de pores dans la membrane plasmique suite à l'exposition des cellules à une brève décharge électrique). Les résultats issus de l'observation microscopique des entités magnétiques à la surface des micro-aimants sont présentés dans les sections suivantes.

II-3-1. Attraction de nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules utilisées sont des nanoparticules commerciales (Myltenyi Biotech) de 50 nm, fonctionnalisées avec de la streptavidine. Pour faciliter les observations, des propriétés fluorescentes leur ont été conférées en faisant interagir les molécules de streptavidine avec des biotines conjuguées à un fluorochrome (Alexa fluor 568, Invitrogen).

La figure II-5 montre les résultats de différents tests d'attraction. Aucun effet d'attraction des nanoparticules de 50nm n'est observé avec le macro-aimant en NdFeB (figure II-5a). La coloration brune de la solution conserve son homogénéité, ce qui indique que la dispersion des particules n'est pas modifiée par la présence du champ, contrairement à ce qui se produit dans le cas de particules magnétiques de 1 μm (figure II-5b). La force magnétique, proportionnelle au volume de la particule, devient dans ce cas suffisamment importante pour qu'un effet soit observé : les particules de 1 μm se retrouvent « collées » à la paroi du tube.

Lorsqu'une solution de quelques microlitres de nanoparticules de taille 50 nm est déposée sur les microaimants TMP, les motifs magnétiques, invisibles en conditions normales, sont révélés par les nanoparticules qui se concentrent au niveau des zones de densité de flux magnétique (B) maximale. Pour illustrer l'intérêt de la réduction d'échelle, ces résultats sont à comparer avec ceux présentés figure II-5a, montrant l'impossibilité d'attirer des nanoparticules de 50 nm avec un macro-aimant en NdFeB.

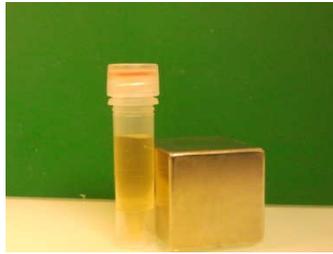


Figure II-5a. Tube contenant une solution de nanoparticules de 50 nm, placé à proximité d'un macro-aimant.



Figure II-5b. Témoin d'attraction par le macro-aimant : tube contenant des particules de $1\mu\text{m}$ mis en contact du même aimant.

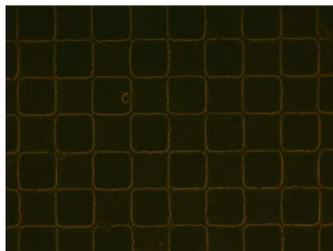


Figure II-5c. Attraction sur un réseau de micro-aimants de nanoparticules de diamètre 50 nm.

II-3-2. *Attraction de liposomes marqués magnétiquement sur réseau de micro-aimants*

Les liposomes sont des vésicules artificielles formées d'une bicouche lipidique (figure II-6c). Ils constituent par conséquent un bon modèle d'étude cellulaire. Lors de leur synthèse par électroformation^{207,208}, il est de plus possible d'incorporer des nanoparticules magnétiques à l'intérieur de ces vésicules (figure II-6b). Des GUV (Giant Unilamellar Vesicles) magnétiques ont été synthétisées pour évaluer la capacité d'attraction des micro-aimants sur des entités biologiques marquées magnétiquement. Les nanoparticules utilisées mesuraient 100 nm de diamètre. Le protocole correspondant à cette expérimentation est présenté en fin de manuscrit (annexe II).

Lors de leur synthèse, pour faciliter les observations microscopiques, les liposomes ont été marqués avec une molécule de NBD PE «1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine N-(7-nitro-2-1 ,3-benzoxadiazol- 4-yl) » qui émet une fluorescence de couleur verte. Les liposomes ont ensuite été déposés sur un réseau de micro-aimants de géométrie 100x100 µm pour observer au microscope à fluorescence leur comportement à la surface du film magnétique. Les résultats montrant l'attraction des liposomes marqués sont présentés figure II-7.

La figure II-7a correspond au cas de liposomes non magnétiques déposés à la surface d'un réseau de micro-aimants (type damier, carrés 100 x 100 µm). On peut constater une dispersion aléatoire de ces liposomes à la surface du film magnétique. Sur la figure II-7b les liposomes marqués magnétiquement sont attirés vers les zones correspondant aux maxima de champ magnétique et révèlent ainsi les frontières entre les domaines d'aimantation opposée. Il est à noter que la charge magnétique des liposomes peut être modulée en ajustant la concentration de nanoparticules dans la solution d'électroformation, ce qui peut permettre par exemple de simuler le comportement de cellules marquées différemment (taille/nombre de nanoparticules variable).

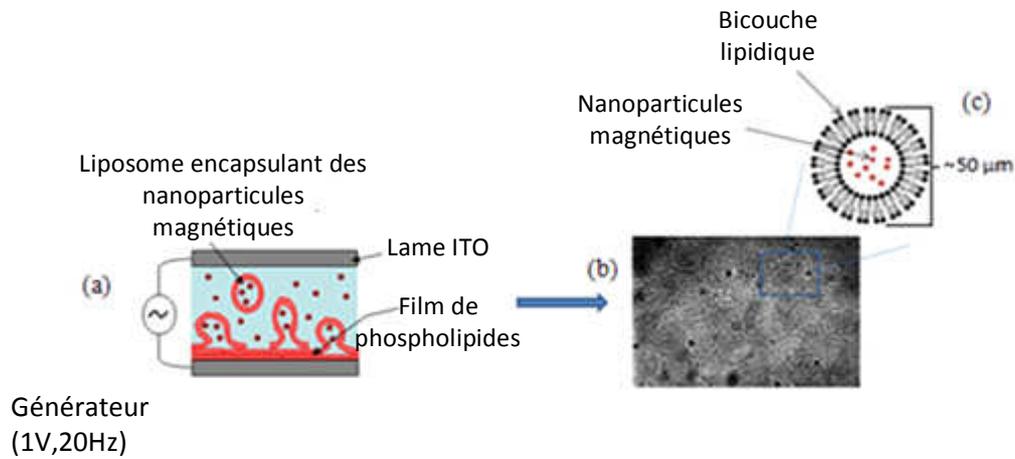


Figure II-6 Synthèse de liposomes encapsulant des nanoparticules magnétiques. (a) Principe de l'électroformation ; (b) Observation par microscopie optique de liposomes ; (c) représentation schématique d'un liposome.

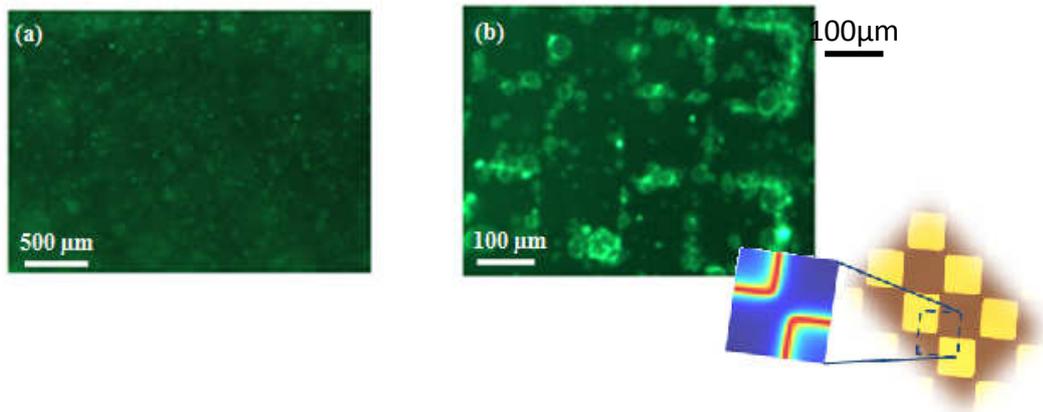


Figure II-7. Attraction de liposomes ayant internalisé des nanoparticules magnétiques sur un réseau de micro-aimants de $100 \times 100 \mu\text{m}$. (a) Témoin : liposomes qui ne contiennent pas de nanoparticules magnétiques; (b) Liposomes contenant des nanoparticules magnétiques.

II-3-3. *Attraction de bactéries marquées magnétiquement sur un réseau de micro-aimants.*

La même manipulation a également été conduite sur des bactéries ayant internalisé des nanoparticules magnétiques de 100 nm après électroporation (figure II-8). Les détails concernant ces expériences sont donnés en annexe III.

Les résultats obtenus montrent qu'une attraction des cellules vers les zones de champ maximum est possible (figure II-9), ce qui laisse supposer que les bactéries ont pu internaliser des nanoparticules lors du processus d'électroporation. Afin de conforter cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience témoin dans laquelle l'étape d'électroporation a été supprimée. Les bactéries mises en présence de nanoparticules n'ont pas été piégées aux maxima de champ.

Toutefois, notons que cette expérimentation n'a pu être réalisée qu'à une seule reprise. Malgré des essais répétés dans des conditions similaires (nanoparticules de même caractéristiques mais toutefois issues de lots différents), l'internalisation des nanoparticules magnétiques de 100 nm dans les bactéries n'a pu être reproduite, sans qu'il soit possible d'en expliquer la raison.

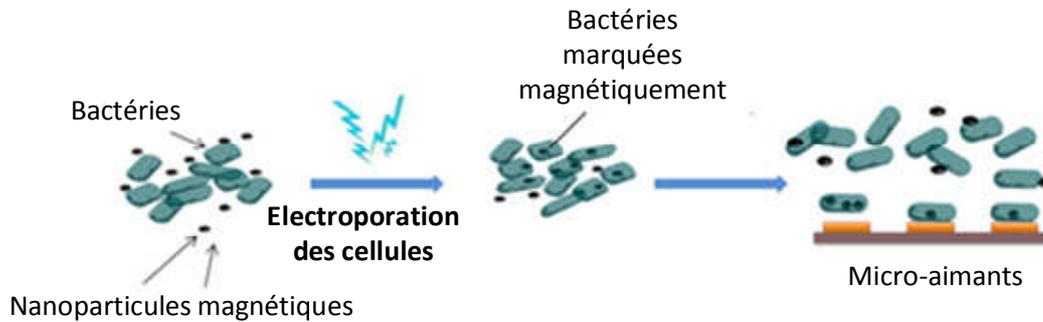


Figure II-8. Principe de l'internalisation de nanoparticules magnétiques dans les bactéries par électroporation.

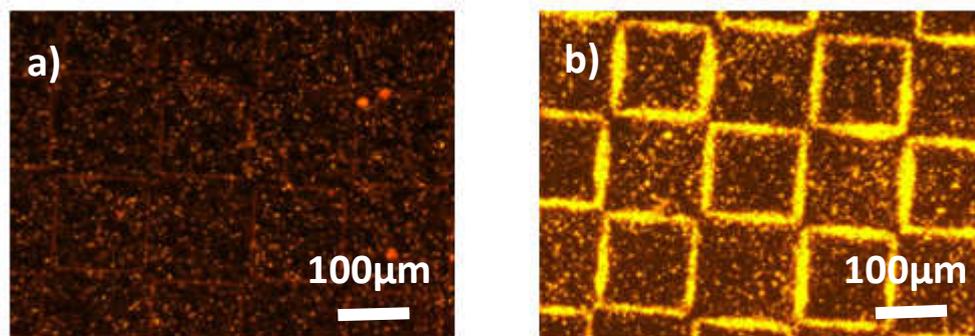


Figure II-9. Attraction de bactéries ayant internalisé des nanoparticules magnétiques par électroporation sur un réseau de micro-aimants de $100 \times 100 \mu\text{m}$. (a) Témoin : bactéries seules, sans électroporation, en présence de nanoparticules magnétiques; (b) bactéries ayant été électroporées en présence de nanoparticules magnétiques.

III) INTEGRATION DES MICRO-AIMANTS DANS UN DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE

La manipulation magnétique des bactéries en solution nécessite l'intégration des micro-aimants dans un dispositif microfluidique. A cet effet, une technique de collage de canaux microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS) a été développée au laboratoire Ampère pour permettre à la fois la protection des microaimants sensibles à la corrosion ainsi que leur réutilisation après chaque expérience. Cette technique sera décrite ultérieurement dans ce chapitre.

III-1. Réalisation du dispositif microfluidique de tri magnétique

La réalisation du dispositif de tri nécessite la fabrication d'un canal microfluidique en PDMS, puis son collage sur le réseau de micro-aimants. Ces différentes étapes de fabrication sont décrites ci-après. Les protocoles détaillés sont donnés en annexe IV à la fin de ce manuscrit.

III-1-1. Fabrication du microcanal

Le canal microfluidique est réalisé en plusieurs étapes à travers un procédé de photolithographie représenté sur la figure II-10. La première étape consiste à former une empreinte en résine sur un substrat en verre pour le moulage du canal en PDMS. Pour cela, un film de résine sèche photosensible²⁰⁹ d'une épaisseur de 50 μ m est laminé sur un substrat de verre puis exposé à des irradiations ultraviolettes (365 nm) à travers un masque en plastique. Ce dernier est obtenu par simple impression haute résolution et porte la géométrie du microcanal à réaliser. La résine employée étant négative, les parties non insolées sont décollées de la surface du substrat en verre après développement dans une solution de carbonate de sodium. De cette façon, l'empreinte obtenue lors de cette étape de développement reproduit le négatif du masque utilisé. Un mélange de PDMS (silicone/agent réticulant : 10/1) est ensuite coulé sur le moule puis réticulé et durci par un recuit dans une étuve. La plaque de PDMS est alors découpée, démoulée puis percée avec un emporte-pièce aux extrémités des canaux afin de pouvoir insérer par la suite les connectiques microfluidiques qui assureront l'entrée et la sortie des fluides.

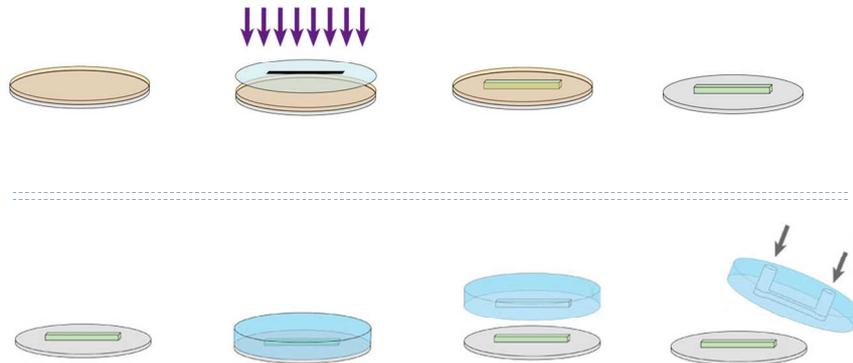


Figure II-10. Représentation schématique des étapes de fabrication du microcanal en PDMS. i. Un film en résine sèche est laminé sur un substrat de verre ; ii. Exposition de la résine sèche aux UV au travers d'un masque en plastique portant la géométrie du microcanal ; iii. Les parties insolées de la résine sont enlevées lors de l'étape de développement ; iv. et v. le moule est obtenu ; v. Un mélange de PDMS/agent réticulant est coulé sur le moule ; vi. La plaque de PDMS est démoulée ; vii. La plaque de PDMS est percée avec un emporte-pièce aux extrémités des canaux.

III-1-2. Revêtement du réseau de micro-aimants par une fine couche de PDMS

Généralement, les canaux en PDMS sont utilisés sur des supports en verre ou en silicium. En effet, il est simple de coller le PDMS sur la surface de ces supports par un traitement plasma²¹⁰. Cette technique consiste à oxyder la surface du PDMS et celle des supports par le traitement plasma. L'oxydation entraîne la formation de groupements silanols (Si-OH) sur les surfaces traitées. La mise en contact de deux surfaces présentant des groupements silanols conduit à une réaction de condensation et la formation de liaisons covalentes Si-O-Si entre les surfaces (Figure II-11).

Il est difficile de réaliser le collage du PDMS via des liaisons covalentes sur des surfaces pauvres en groupements hydroxyles. Ceci est le cas de beaucoup de supports, même après des traitements plasma. Une méthode de collage de PDMS sur tous types de supports a été développée au laboratoire et testée sur différents substrats qui ne présentent aucune adhésion au PDMS²¹¹. Cette technique consiste à fluidifier le PDMS par l'ajout d'un solvant organique (l'heptane) puis à l'étaler sur le substrat en une fine couche par rotation à grande vitesse (spin-coating). Le recuit de cette fine couche de PDMS directement sur la surface du substrat permet une adhésion suffisamment stable du polymère sur le substrat. Ceci est certainement dû à la formation d'un grand nombre de liaisons faibles (interactions de Van der Waals) entre la fine couche et la surface du substrat suite à l'étalement. Par ailleurs, la réversibilité de ces liaisons non-covalentes permet le décollement de la couche mince par action mécanique (frottements), ce qui rend possible la réutilisation de ces supports. Ceci est d'un grand intérêt notamment quand il s'agit de substrats coûteux ou difficiles à produire.

Grace à cette technique, il est simple de coller un canal en PDMS sur les substrats à travers la fine couche en PDMS par la technique de traitement plasma. Des liaisons covalentes Si-O-Si sont ainsi formées entre les deux surfaces de PDMS assurant une bonne adhésion du canal sur le substrat. La technique de collage PDMS/substrat via l'emploi d'une fine couche de PDMS intermédiaire a dû être adaptée aux micro-aimants. En effet, il était important d'optimiser l'épaisseur de la fine couche à déposer sur les micro-aimants afin d'obtenir une force d'attraction suffisante des bactéries marquées magnétiquement.

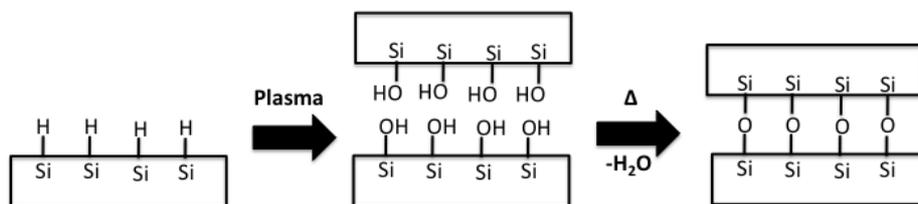


Figure II-11. Représentation schématique de la formation des groupements silanols sur la surface des substrats (verre, PDMS, silicium...) après traitement plasma et du collage irréversible des surfaces traitées via les liaisons covalentes Si-O-Si.

III-2. Influence de l'épaisseur de la couche de PDMS sur l'attraction magnétique

Étant donné que l'intensité du champ magnétique diminue avec l'éloignement de la surface des micro-aimants, l'épaisseur de la couche de PDMS déposée pour le collage du microcanal est un paramètre qu'il est impératif de contrôler pour obtenir une attraction magnétique efficace et uniforme des bactéries. Il a déjà été montré au laboratoire (travaux de C.Vézy) qu'en présence d'une couche de PDMS de 8 μm , un réseau de micro-aimants de Néodyme-Fer-Bore pouvait attirer des particules superparamagnétiques de 100 nm²¹¹. Cependant, cette même épaisseur de couche empêche l'attraction de nanoparticules de 50 nm de diamètre, alors que celle-ci est possible en absence de PDMS (cf. Figure II-5c). Ceci indique qu'à partir d'une certaine distance de la surface de l'aimant, l'intensité du champ magnétique et du gradient de champ ne sont plus suffisantes pour assurer l'attraction des nanoparticules de faible diamètre. Sachant que nous souhaitons limiter au maximum la charge magnétique employée pour le marquage des bactéries (utilisation de nanoparticules de type USPIO), il était indispensable de diminuer l'épaisseur de la couche de PDMS déposée sur les réseaux de micro-aimants pour permettre leur attraction. Nous avons donc entrepris dans le cadre d'une collaboration avec un autre doctorant du laboratoire (Sylvain Toru) un travail d'optimisation de l'épaisseur de couche déposée sur les micro-aimants de manière à obtenir un bon scellement du canal microfluidique ainsi qu'une force d'attraction significative pour les nanoparticules de 50 nm.

Afin de contrôler l'épaisseur de la couche de PDMS déposée à la surface de l'aimant, nous avons étudié l'influence de la viscosité du PDMS fluide (rapport PDMS / heptane) et de la vitesse de rotation de la tournette lors de l'étape d'enduction. Conformément à ce que l'on pouvait prévoir, l'épaisseur de la couche de PDMS déposée diminue en même temps que le rapport PDMS/heptane, mais également avec l'augmentation de la vitesse de rotation de l'aimant lors de l'étape d'enduction. Il est ainsi possible de contrôler l'épaisseur de la couche déposée dans une fenêtre allant d'une dizaine de micromètres à quelques centaines de nanomètres (figure II-12).

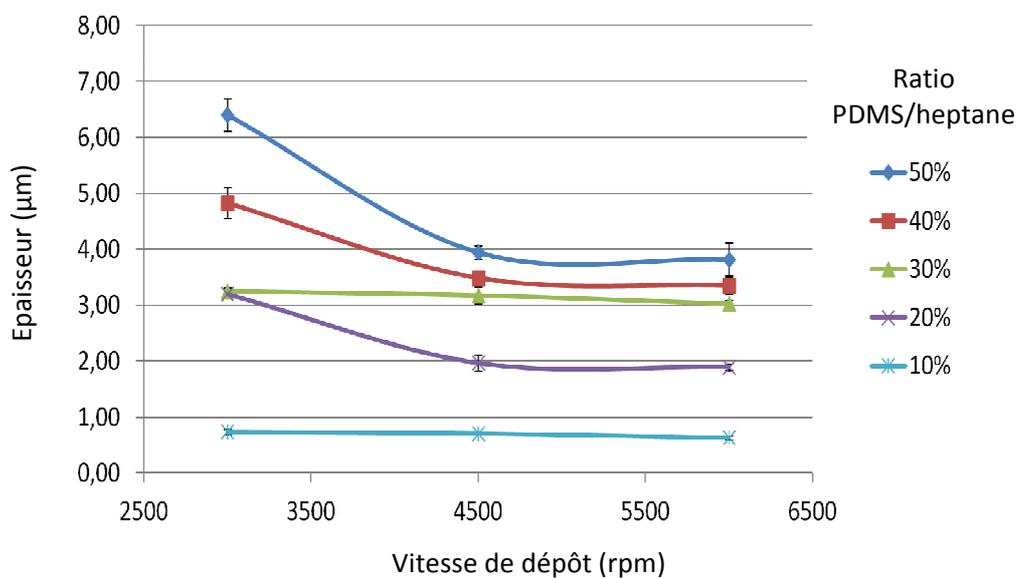


Figure II-12. Epaisseur de la couche de PDMS déposée à la surface du film magnétique en fonction du ratio PDMS/heptane et de la vitesse de dépôt (mesure au profilomètre).

L'influence de l'épaisseur de la couche de PDMS sur l'attraction magnétique des particules superparamagnétiques de 50 nm a ensuite été étudiée expérimentalement. Cette étude a été menée sur un même film magnétique portant des motifs en damiers de $100 \times 100 \mu\text{m}$ recouvert d'une couche de PDMS de $2 \mu\text{m}$ (figure II-13a.) ou de 800 nm (figure II-13b), au-dessus de laquelle a été déposée une goutte de solution contenant des nanoparticules superparamagnétiques fluorescentes de 50 nm. Pour chacun des deux tests effectués, une partie de la couche de PDMS (partie gauche sur les photos) a été décollée du film afin de comparer les attractions. Les observations par microscopie à fluorescence indiquent une bonne attraction des nanoparticules sur le film magnétique en absence de PDMS ainsi qu'en présence d'une couche d'épaisseur 800 nm. En effet, les particules s'organisent à la surface en révélant les frontières entre les motifs magnétiques. Par contre, cette organisation de nanoparticules n'est pas observée sur la surface en présence de la couche de $2 \mu\text{m}$, en raison d'une force magnétique insuffisante à cette distance du film. Le collage par traitement plasma des canaux microfluidiques en PDMS sur la surface des films magnétiques via la fine couche de PDMS a montré une bonne stabilité pour des épaisseurs de couche inférieures à 800 nm (jusqu'à 200 nm), y compris pour des pressions dans le canal de plusieurs centaines de mbar. Dans la suite du manuscrit, la séparation des bactéries marquées magnétiquement est étudiée dans des dispositifs réalisés à partir de couches de PDMS d'épaisseur 500 nm, obtenues pour un rapport PDMS/heptane de 5 % et pour une vitesse de dépôt de 6000 rpm.

IV) CAPACITE DE TRI DU DISPOSITIF

Afin de démontrer la capacité du dispositif microfluidique à trier magnétiquement des particules, des études préliminaires ont été conduites sur des mélanges de billes magnétiques et non magnétiques (cf. protocole annexe V). Un mélange de deux populations de billes fluorescentes de $1 \mu\text{m}$, l'une magnétique (fluorescence orange) et l'autre non magnétique (fluorescence bleue) a été introduit dans le dispositif de tri (figure II-14). Immédiatement après l'injection du mélange, les billes magnétiques de fluorescence orange ont été piégées sur les micro-aimants au niveau des zones d'induction magnétique maximale (figure II-14a), tandis que les billes non magnétiques de fluorescence bleue ont continué à se déplacer librement vers la sortie du microcanal (figure II-14b). Des expériences de tri de microparticules magnétiques et non magnétiques, complétées par une quantification en cytométrie de flux ont également été réalisées par L-F Zanini sur des microaimants de même type²¹².

Il a été également possible, en augmentant la pression en entrée du canal (d'un facteur 10), de décrocher les particules magnétiques de la surface et de les éluer vers la sortie du canal. Ce résultat indique que la force d'écoulement du fluide, à partir d'un certain débit, peut contrer la force d'attraction magnétique. Cette force d'écoulement pourra ainsi être employée comme moyen de récupération des bactéries attirées magnétiquement après la phase de tri.

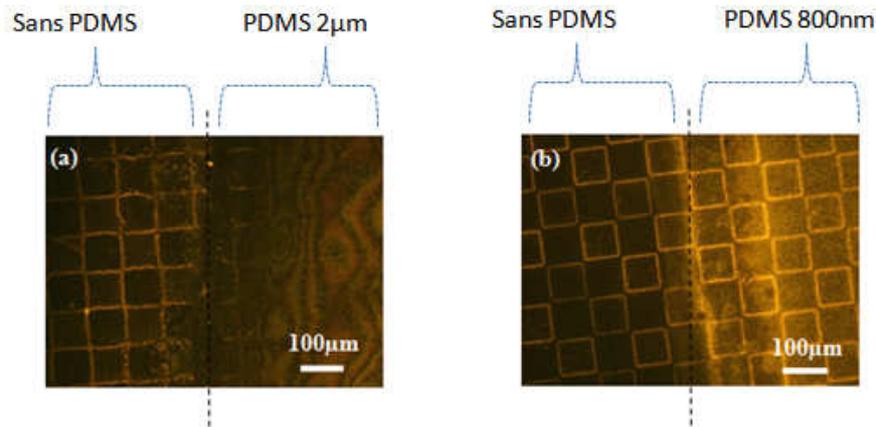


Figure II-13. Influence de l'épaisseur de la couche de PDMS recouvrant le film magnétique sur l'attraction de nanoparticules de 50nm de diamètre. (a) A gauche la surface n'est pas recouverte de PDMS. L'attraction est possible. A droite la surface recouverte d'une couche de PDMS de 2 µm d'épaisseur ne permet pas l'attraction. (b) A droite comme à gauche où la surface est recouverte d'une couche de PDMS de 800 nm d'épaisseur, l'attraction des nanoparticules est possible. La fluorescence des particules est liée à un marquage préalable de celles-ci par des biotines fluorescentes (couleur orange).

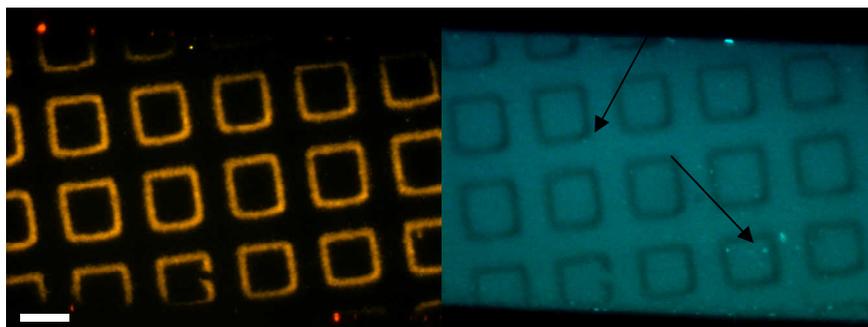


Figure II-14. Image du microcanal durant la séparation. (a) Image des billes magnétiques (fluorescence orange), attirées au niveau des zones de champ maximal dans le microcanal ; (b) Image des billes non magnétiques (points lumineux) qui se déplacent librement dans le canal.

CONCLUSIONS

A partir d'un film magnétique de Néodyme-Fer-Bore (NdFeB), nos partenaires de l'institut Néel sont parvenus à réaliser des réseaux de micro-aimants plats, permanents, capables d'engendrer des forces d'attraction pour les particules magnétiques de très faible diamètre largement supérieures à celles obtenues avec des macro-aimants conventionnels. Ces films magnétiques ont été intégrés avec succès dans des microcanaux en PDMS par le biais d'un collage plasma rendu possible grâce à l'emploi d'une fine couche de PDMS jouant le rôle d'interface. Cette étape de collage a également été optimisée de manière à conserver des forces d'attraction suffisamment efficaces pour attirer des nanoparticules de 50 nm. Ce dispositif microfluidique est tout à fait adapté au tri des particules magnétiques pouvant être séparées de particules non magnétiques sous flux. Enfin, l'élution des entités attirées à la surface des aimants peut être réalisée par augmentation du débit dans le microcanal.

L'outil de tri magnétique microfluidique ainsi développé est basé sur l'emploi de micro-aimants dont le fonctionnement ne nécessite aucune source de champ externe et n'induisant aucun échauffement de la solution. De plus, la démarche de fabrication suivie, reposant sur des techniques classiquement employées en microfluidique, permet d'aboutir à un dispositif de tri magnétique d'une grande simplicité par rapport aux autres dispositifs existants. Ce système a été utilisé dans les travaux présentés aux chapitres suivants, portant sur le tri de bactéries marquées magnétiquement.

CHAPITRE III : APPLICATION A L'ISOLEMENT SPECIFIQUE
D'UNE POPULATION BACTERIENNE MARQUEE
MAGNETIQUEMENT APRES HYBRIDATION *IN SITU*

INTRODUCTION

Le niveau extrêmement élevé de la diversité des bactéries dans l'environnement et leurs propriétés physiologiques qui limitent encore à moins de 1 % celles capables de se développer *in vitro* requièrent le développement de technologies complémentaires aussi bien aux approches culturelles classiques qu'à la métagénomique pour compléter les travaux visant à les détecter et les identifier ainsi qu'à en étudier gènes, fonctions et activités. Une de ces approches consiste à trier les cellules bactériennes sur des critères taxonomiques ou fonctionnels de façon à focaliser les travaux sur certains organismes, la répétition de ces stratégies devant graduellement conduire à l'exhaustivité. Cette approche requiert un marquage spécifique des cellules ciblées qui seront ensuite séparées des cellules non marquées puis récupérées pour être étudiées spécifiquement via une approche génomique ou après mise en culture⁷³.

Dans les chapitres précédents nous avons référencé différents procédés de tri pouvant être utilisés en microbiologie avec une attention particulière portée sur les techniques relevant du tri par fluorescence et par magnétisme. Dans le cadre restreint du processus de tri magnétique, nous avons vu que les systèmes de tri conventionnels (macro-aimants, système MACS®) offraient des méthodologies de tri convenablement exploitables en microbiologie même si leur échelle macroscopique pouvait parfois susciter certaines limites^{138,213}. Ces dernières années ont toutefois été marquées par le développement de systèmes de tri magnétique miniaturisés^{214,188}. Outre le fait que la miniaturisation des sources magnétiques permet d'augmenter considérablement les forces magnétiques, les microsystèmes offrent une meilleure maîtrise de ces forces, ainsi que la perspective de pouvoir regrouper au sein d'un seul dispositif (lab-on-chip) toutes les étapes d'une étude analytique (depuis le prélèvement de l'échantillon jusqu'à l'identification des composants en passant par la séparation des substances)²⁰¹.

Le système de tri magnétique miniature et autonome présenté au chapitre précédent, basé sur l'intégration microfluidique de micro-aimants permanents, permet de lever les limites des microsystèmes de tri magnétique actuels^{186,189} (nécessité d'une source d'alimentation externe, complexité de fabrication). Son applicabilité au tri de particules magnétiques a été montrée qualitativement au chapitre II. Le présent chapitre vise à montrer que ce dispositif est également adapté au tri spécifique de cellules bactériennes marquées magnétiquement et à évaluer quantitativement ses performances. A cette fin, une souche bactérienne modèle a été marquée magnétiquement par hybridation *in situ* avec des sondes polyribonucléiques biotinylées avant incubation des cellules avec des nanoparticules superparamagnétiques recouvertes de streptavidine. A l'issue de ce marquage, ces cellules ont été mélangées selon différentes concentrations avec des cellules d'une autre souche bactérienne puis le mélange soumis au système de tri pour en évaluer le potentiel en termes de sensibilité et de spécificité.

I) MATÉRIELS ET MÉTHODES

I-1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les deux souches bactériennes utilisées dans cette étude appartiennent à *Escherichia coli* DH10 β , dont les cellules ont été marquées magnétiquement et *Acinetobacter sp.* ADP1. Ces souches ont été cultivées dans le milieu Luria Bertani (LB) liquide à 37°C.

I-2. Préparation des sondes

I-2-1. Extraction et purification des acides nucléiques d'*Escherichia coli* DH10 β

L'ADN génomique d'*Escherichia coli* DH10 β a été obtenu à l'aide du kit d'extraction d'ADN NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel en suivant les recommandations du fabricant.

I-2-2. Amplification PCR de la région hypervariable du domaine III de l'ARNr 23S d'*Escherichia coli* DH10 β

Le fragment du gène correspondant à la région variable du domaine III de l'ARN 23S d'*Escherichia coli* DH5 α a été amplifié par PCR. Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées étaient 5'-MADGCGTAGBCGAWGG-3' (1900V ; Ludwig et al 1994¹⁰⁷) et 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGACCWGTGTCSGTTTHBGTAC-3' (317RT Ludwig et al, 1994¹⁰⁷). Cette dernière amorce contenait la séquence du promoteur de la T7 ARN polymérase nécessaire pour la transcription *in vitro* réalisée ultérieurement. Le mélange enzymatique pour la PCR a été réalisé à l'aide du kit Illustra® Hot Start Mix RTG PCR beads de GE Healthcare en suivant les recommandations du fabricant. Les paramètres de cycles utilisés pour l'amplification étaient les suivants : une étape à 95°C pendant 10 minutes suivie de 35 cycles comprenant les étapes suivantes : 95°C pendant 30 s, 53°C pendant 60 s et 72°C pendant 90 s. Une étape finale à 72°C pendant 10 min a été réalisée à la fin de ces 35 cycles. Les produits PCR ont ensuite été analysés après migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1 % (poids / volume) colorés au bromure d'éthidium (BET) pour confirmer la taille attendue de 236 nucléotides des produits PCR eux-mêmes purifiés à l'aide du kit de purification de l'ADN Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit de GE Healthcare. Ces fragments d'ADN purifiés ont été utilisés comme matrice pour la transcription *in vitro*.

I-2-3. Transcription *in vitro* des fragments d'ARNr 23S amplifiés

La transcription des fragments PCR d'ARNr 23S (région variable du domaine III de l'ARN 23S) d'*Escherichia coli* DH10 β a été effectuée en appliquant un kit de transcription d'ARN d'Invitrogen. Les ARN obtenus ont ensuite été purifiés avec le kit « NucleoSpin® RNA purification kit » de Macherey-Nagel.

I-2-4. *Biotinylation des transcrits d'ADN*

Les transcrits des fragments d'ADNr 23S ont été biotinylés à l'aide du kit commercial de marquage Label IT® Nucleic Acid Labeling Reagents (MIRUS) en suivant les recommandations du fabricant.

I-3. *Hybridation in situ*

I-3-1. *Fixation des cellules bactériennes*

Les fixations cellulaires ont été réalisées à partir de cultures bactériennes en croissance exponentielle (Densité Optique = 0,8-1) avec l'agent fixateur chimique paraformaldéhyde. Pour cela un volume de 2 ml de culture a été prélevé puis centrifugé 10 min à 2500xg. Le culot cellulaire a été repris dans 500 µl de paraformaldéhyde dilué a 3 % dans du tampon phosphate salin (PBS: NaCl 130 mm, 10 mM de tampon phosphate salin, pH 7,2) puis incubé 12h à 4°C. Les bactéries fixées ont été lavées trois fois par centrifugation (2500xg pendant 10 min) avec du PBS pour être reprises au final dans 500 µl de ce même tampon.

I-3-2. *Optimisation des conditions d'hybridation*

Un volume de 10 µl de chaque suspension de bactéries fixées (approximativement 10⁷ bactéries) a été déposé sur une lame de microscope, les cellules étant immobilisées selon la procédure suivante : les dépôts ont été séchés à température ambiante et les cellules déshydratées par incubation de 3 min dans un bain d'éthanol à successivement 50 %, 80 % et 90 %. Chaque dépôt a été recouvert de 25 µl de tampon contenant 100mM de NaCl, 0.01 % de SDS, 20mM de tampon Tris-HCl (pH8.0), 5mM d'EDTA (pH8.0), 600ng de la solution de sonde biotinylée et des quantités variables de formamide (80, 85, 90 et 95 %). Les lames ont ensuite été placées dans des chambres isotoniques équilibrées pour éviter l'évaporation du tampon durant l'incubation. Les paramètres d'hybridation ont été les suivants : incubation à 80°C pendant 30 min puis transfert dans un four à hybridation pour incubation pendant 12h à différentes température entre 50 et 58°C. Après hybridation, les lames ont été immergées dans de l'eau distillée puis incubées 1h dans une solution de streptavidine-cy3 (Invitrogen®) à 5 µg/ml à température ambiante et à l'obscurité. Les lames ont finalement été rincées avec de l'eau distillée pendant 15 minutes puis observées sous un microscope à épifluorescence (Carl Zeiss AxioImager / caméra AxioCam H5m) avec des filtres correspondant aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission du marqueur cy3 (550/570nm).

I-4. Marquage des cellules hybridées avec des nanoparticules magnétiques

Les hybridations *in situ* pour le marquage magnétique ont été effectuées en milieu liquide. Un volume de 10 µl de chaque suspension de cellules bactériennes fixées a été placé dans un tube à essai (Eppendorf Safe-Lock PCR clean microcentrifuge tube 0,5ml) les cellules étant recouvertes de 30 µL de tampon d'hybridation contenant 100mM de NaCl, 0.01 % de SDS, 20mM de tampon Tris-HCl (pH8.0), 5mM d'EDTA (pH8.0), 1 µg de sondes biotinylées et 80 % de formamide. A la suite de ces hybridations, 60 µl de nanoparticules superparamagnétiques de 50 nm de diamètre (Streptavidin Microbeads 50 nm MiltenyiBiotec®) ont été ajoutées aux échantillons qui ont été incubés une nuit à 4° C. Deux types de contrôles ont été réalisés, à partir d'une suspension de bactéries non hybridées par la sonde mais soumises aux conditions d'hybridation et soit incubées avec des nanoparticules soit sans incubation avec ces nanoparticules. Pour vérifier l'état du marquage, un volume de 10 µl de chaque échantillon a été déposé sur un réseau de micro-aimants. Avant ce dépôt, 1µl de bromure d'éthidium (1 µg/µl) permettant de marquer les cellules bactériennes d'une fluorescence orange a été ajouté aux échantillons. Les réseaux de micro-aimants sur lesquels ont été déposés les bactéries ont alors été visualisés sous microscope à épifluorescence avec des filtres correspondant aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission du BET (524/605 nm).

I-5. Construction du système microfluidique

Les protocoles du processus de fabrication par TMP des micro-aimants utilisés (100x100 µm) et leur intégration en système microfluidique sont tels qu'ils ont été décrits dans le chapitre II. Pour les détails techniques se référer aux annexes I et IV en fin de manuscrit.

I-6. Tri d'un mélange de cellules bactériennes marquées et non marquées

Un mélange de cellules d'*Escherichia coli* DH10β et d'*Acinetobacter sp.* ADP1 issues d'hybridation *in situ* magnétique a été réalisé dans une proportion d'environ 5 cellules *Escherichia coli* DH10β pour 10 000 cellules d'*Acinetobacter sp.* ADP1 (0,05 % de cellules cibles). Le volume final du mélange était de 25 µl. Ce mélange a constitué la fraction 1. Il a été injecté à flux constant (1 µl/min) dans le canal microfluidique placé au-dessus du réseau de micro-aimants. Après avoir passé la totalité du mélange cellulaire dans le canal, un rinçage avec de l'eau distillée a été effectué. La solution récupérée a constitué la fraction 2. Les cellules qui ont pu être attirées sur le réseau de micro-aimants ont ensuite été éluées en augmentant significativement la vitesse du flux (100 µl/min) dans le microcanal. Cet éluat cellulaire a constitué la fraction 3.

I-7. Identification et quantification de cellules bactériennes dans les différentes fractions de tri par PCR quantitative (qPCR)

Afin d'examiner l'efficacité de l'enrichissement cellulaire, des amplifications PCR quantitatives (qPCR) ont été réalisées sur les différentes fractions de tri pour identifier et quantifier les deux types de cellules bactériennes. Deux gènes différents, dont les séquences sont spécifiques à chacune des bactéries, ont été utilisés pour être amplifiés : le gène *recE* pour *Escherichia coli* DH10 β et le gène *recA* pour *Acinetobacter sp.* ADP1. Les qPCR ont été réalisées dans un Rotor-Gene 6000 real-time rotary system (Corbett Life Science) en utilisant le kit SYBR SensiMixPlus (Quantace, Londres, Royaume-Uni). Les séquences des amorces utilisées pour détecter le gène *recE* étaient les suivantes: 5'-GCCCCAGCGGCAAAGCCATA-3' et 5'-CCGCCGTACAAACGCCGGAA-3'. Les amorces utilisées pour détecter le gène *recA* étaient les suivantes : 5'-TGGGCTGCCAAACATTACGCC-3' et 5'-ATGGGCGACTCCCACATGGGTT-3'. Pour les amplifications, les paramètres du cycle étaient de 95°C pendant 10 minutes, suivis de 45 cycles de 95°C pendant 15 s, 60°C pendant 20 s et 72°C pendant 20 s, suivis d'une analyse de la courbe de fusion permettant de vérifier la spécificité de l'amplification.

II) RESULTATS

II-1. Marquage des cellules bactériennes

Le concept de « probe-based cell fishing » permet de réaliser une hybridation *in situ* magnétique grâce à l'utilisation de sondes polyribonucléotidiques biotinylées qui, une fois hybridées avec leurs cibles intracellulaires, forment des structures secondaires qui s'enchevêtrent les unes aux autres pour finalement établir un réseau en dehors des enveloppes de la bactérie¹³⁹. Ce réseau de sondes biotinylées à la périphérie des cellules va permettre l'ancrage de nanoparticules magnétiques recouvertes de streptavidine (liaison biotine-streptavidine) (cf. chapitre I). Cette stratégie de marquage a été utilisée, dans le cadre de cette étude, pour marquer les cellules cibles appartenant à l'espèce *Escherichia coli* DH10 β .

II-1-1. Cible du marquage

La cible du marquage spécifique d'*E.coli* par hybridation *in situ* était une séquence nucléique utilisée pour la taxonomie bactérienne : la région hypervariable du domaine III de l'ARNr 23S. Comme l'ARNr 16S, la molécule d'ARNr 23S est une mosaïque composée de régions dont la séquence présente un niveau de conservation extrêmement différent entre organismes. L'analyse bioinformatique de cette molécule d'ARN permet d'établir un lien phylogénétique entre les bactéries.

D'autre part, les régions variables du domaine III de l'ARNr 23S sont utilisées comme cibles pour l'identification taxonomique comme cela a déjà été le cas chez de nombreux phyla bactériens^{215,12,108,217}. L'alignement et la comparaison des séquences du domaine III de l'ARNr 23S permet en effet de désigner des signatures nucléotidiques dont la spécificité varie de l'espèce ou plus généralement du genre aux plus hauts niveaux taxonomiques. Dans notre cas par exemple, le pourcentage de similarité de séquences du domaine III de l'ARNr 23S entre *Acinetobacter sp.* ADP1 et *Escherichia coli* DH10 β était de 70 %, comme le montre l'alignement des séquences du domaine III de leurs ADNr 23S respectifs figure III-1, ce qui nous a permis dans les conditions d'hybridation utilisées d'établir une distinction entre ces deux bactéries.

II-1-2. Préparation des sondes

Les sondes employées sont des sondes polyribonucléiques composées d'acides ribonucléiques (ARN) synthétisées par transcription *in vitro* à partir d'un fragment d'ADN cible. La transcription est un processus de biosynthèse catalysée par une ARN polymérase reposant sur la complémentarité des bases qui permet la synthèse d'un ARN simple brin à partir d'un fragment d'ADN double brin. L'ARN polymérase reconnaît et se fixe sur un site spécifique de l'ADN appelé promoteur situé en 5' du brin d'ADN non transcrit et se sert du brin transcrit comme modèle pour synthétiser une seule chaîne de ribonucléotides qui lui est complémentaire (figure III-2).

L'ARNr 23S dans une cellule est issu du processus de transcription, la région de l'ADN matrice à l'origine de cette synthèse étant nommée l'ADNr 23S. Le domaine III hypervariable de l'ARNr 23S qui a été ciblé pour amplifier la sonde polyribonucléique est une région particulière de cet ARN de 256pb (figure III-3a). L'une des amorces PCR utilisées contient la séquence d'un promoteur d'ARN polymérase, la T7 ARN polymérase. Cette amorce a été choisie pour qu'à l'issue des amplifications, le promoteur soit placé à l'opposé du promoteur naturel de la bactérie sur le fragment amplifié. La transcription *in vitro* permettait donc de transcrire un ARN complémentaire à celui présent dans la cellule (figure III-3b).

	Expect 1e-24	Identities 174/247(70%)	Gaps 11/247(4%)	Strand Plus/Plus
<i>E.Coli DH10β</i> 13	ATGGGAACAGGTTAATATTCCTGTACTT	-GGTGTACTCGGARGGGGGACGGAGAAGG	71	
<i>Acinetobacter sp. ADP1</i> 1	ATGGGAATGGTTAATATTCCTGTACTT	-TAATGCGATGAGAGGCGGAGAAGG	59	
<i>E.Coli DH10β</i> 72	CTATGTTGGCCGGGCGACGGTTGTCCCGGTTAAGCGITAGGCTGGTTTCCAGGCAAA	131		
<i>Acinetobacter sp. ADP1</i> 60	TTAGTCAGCCTGGCGTGGTTGTCCAGGTGGAAGACAGTAGGCATGCATCTTAGGCAAA	119		
<i>E.Coli DH10β</i> 132	TCC-GGAAAATCAAGGCTGAGGCGTGATGACGAGGCACTACGGTGCT	---GAAGCAACA	187	
<i>Acinetobacter sp. ADP1</i> 120	TCCGGGTGCTCTATGCTGAGAGTCGATAGCAAG	---CTAGTTACTAGCGAAGTGGCTG	176	
<i>E.Coli DH10β</i> 188	ATGCCCTGCTCCAGGAAAAGCCTCTAAGCATCAGGTA-ACATCAATCGTACCCCAAC	246		
<i>Acinetobacter sp. ADP1</i> 177	ATACCATACTCCAGAAAAGTCTCTAAGCTACAGTTACACA-GGAATCGTACCCGAAC	235		
<i>E.Coli DH10β</i> 247	CGACACA	253		
<i>Acinetobacter sp. ADP1</i> 236	CGACACA	242		

Figure III-1. Alignement de la séquence du domaine III hypervariable de l'ADNr 23S d'*Acinetobacter sp. ADP1* et d'*Escherichia coli DH10β*

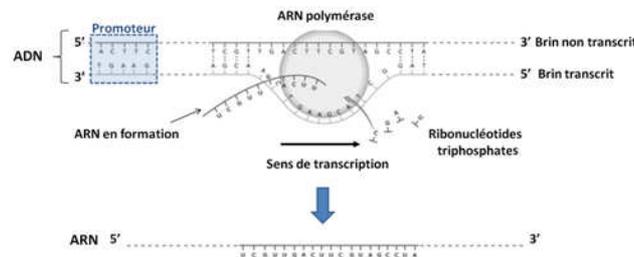


Figure III-2. Schéma du mécanisme général de la transcription de l'ADN en ARN

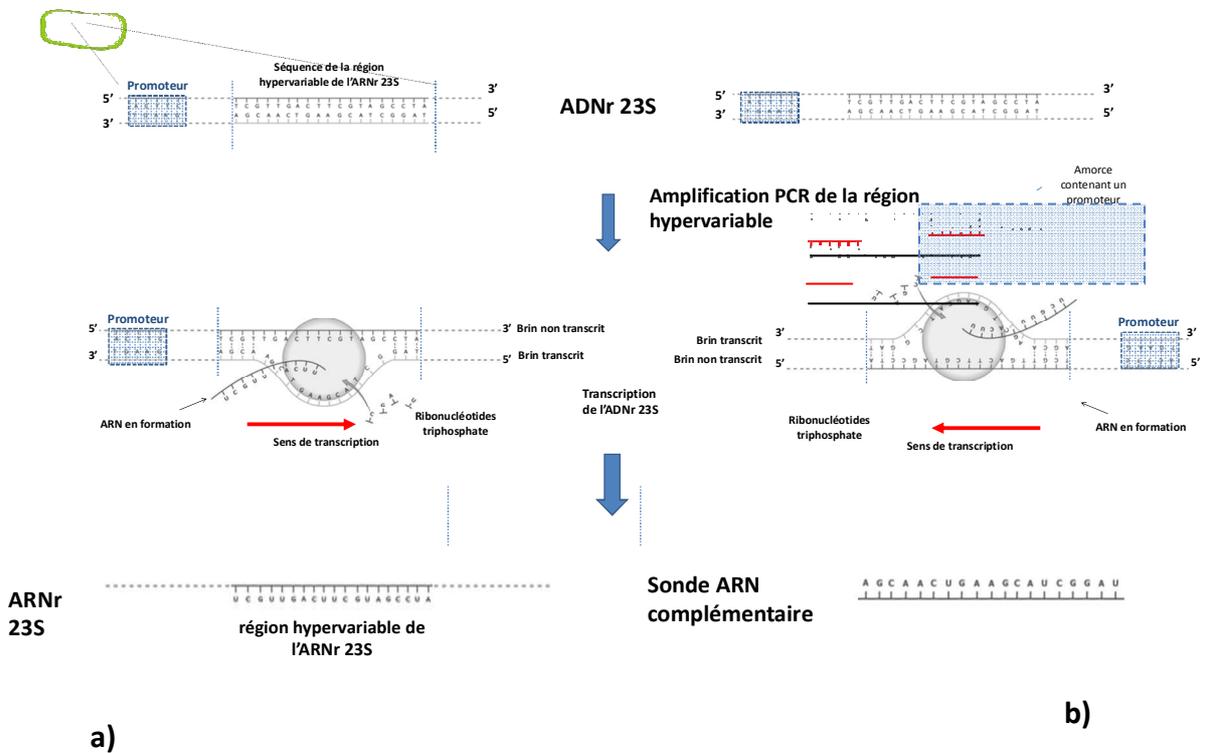


Figure III-3. a) Transcription de l'ADNr 23S dans la bactérie ; b) Synthèse des sondes polyribonucléotidiques par transcription in vitro

II-2. Hybridation *in situ*

II-2-1. Optimisation des conditions d'hybridation

Indépendamment de leur séquence nucléotidique, la spécificité des sondes basée sur l'appariement de la molécule d'acide nucléique simple brin (la sonde) sur un fragment d'acide nucléique complémentaire est fortement dépendante des conditions physico-chimiques dans lesquelles va s'opérer l'hybridation. La température et la concentration ionique de la solution d'hybridation sont les deux paramètres à prendre en compte pour définir les conditions assurant la meilleure spécificité.

D'un point de vue pratique, l'ajout dans le tampon d'hybridation d'un agent dénaturant comme le formamide permet d'augmenter la drastité (stringence) de l'hybridation sans modification des autres paramètres, notamment la température. Les conditions optimales d'hybridation ont été définies après visualisation directe sous microscope des résultats d'hybridation des cellules cibles et non cibles immobilisées sur lames et incubées dans une solution de streptavidines marquées à la Cyanine 3 permettant d'observer les cellules hybridées par leur fluorescence orange. Les résultats présentés figure III-4 montrent que la condition pour laquelle la plus grande fraction de cellules cibles (98 à 100 % des cellules immobilisées sur la lame) affichaient une fluorescence a été obtenue en utilisant une concentration de formamide de 80 % parmi les 4 concentrations testées (80, 85, 90 et 95 %) pour une température d'hybridation de 53°C parmi les 9 températures différentes étudiées (comprises entre 50 et 58°C) (figure III-4a et III-4b). Dans ces conditions, la spécificité de l'hybridation était bonne puisqu'aucune fluorescence n'était détectable avec les cellules d'*Acinetobacter sp.* ADP1 (figure III-4c et III-4d).

Des conditions d'hybridation plus sévères (stringentes) (95 % formamide, 58°C par exemple) ne permettaient pas l'hybridation des sondes avec leurs cibles (figure III-4e et III-4f) quand, au contraire, des conditions d'hybridations plus modérées (80 % formamide, 50°C) conduisaient à l'apparition d'hybridation non spécifique avec une fraction des cellules d'*Acinetobacter* non cibles (figure III-4g et III-4h).

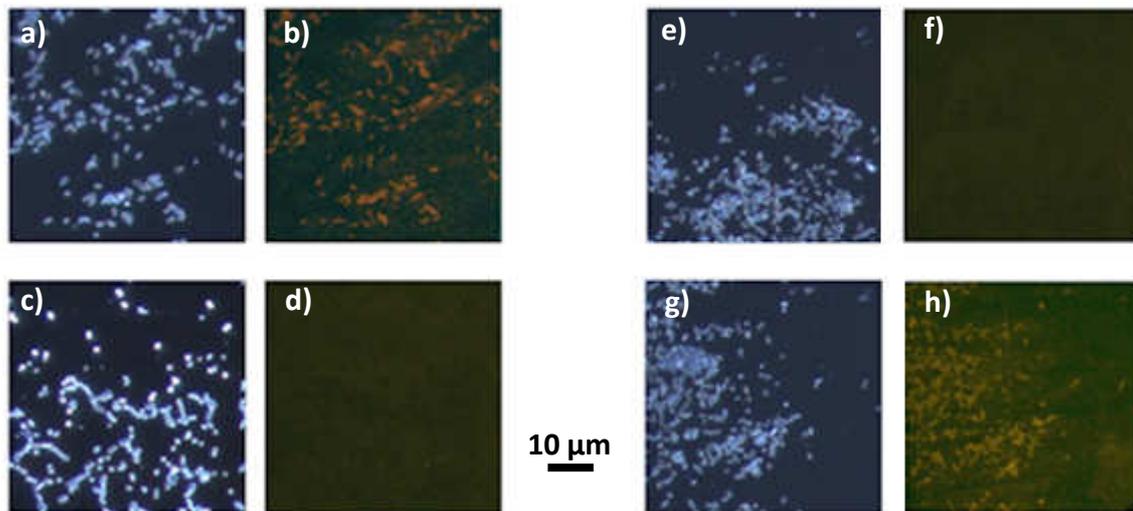


Figure III-4. Détection fluorescente de l'hybridation in situ effectuée avec les sondes polyribonucléotidiques ciblant le domaine III de l'ARNr 23S d'*Escherichia coli* DH10β. (a et b) *Escherichia coli* DH10β en condition d'hybridation optimale ; (c et d) Témoin *Acinetobacter* sp. ADP1 en condition d'hybridation optimale ; (e et f) *Escherichia coli* DH10β en conditions d'hybridation stringentes ; (g et h) Témoin *Acinetobacter* sp. ADP1. en conditions d'hybridation peu stringentes.

II-2-2. Marquage des cellules hybridées avec des nanoparticules magnétiques

Pour contrôler la proportion des cellules marquées et leur capacité à être attirées, des échantillons des suspensions bactériennes soumises au protocole d'hybridation *in situ* et marquage magnétique ont été déposés à la surface de micro-aimants (motifs 100 x 100 µm) (cf. figure III-5).

L'attraction des cellules entraîne l'apparition de motifs fluorescents qui reflètent la géométrie des motifs magnétiques (damier de 100 x 100 µm). Les cellules cibles *E.coli* hybridées avec des sondes biotinylées et mélangées avec des nanoparticules magnétiques sont attirées. Elles se disposent aux emplacements correspondant aux maxima d'intensité du champ magnétique (figure III-5a et III-5b). Lorsque l'étape d'hybridation est ignorée, après avoir placé un mélange de bactéries et de nanoparticules au-dessus de la surface de micro-aimants, aucun motif fluorescent ne peut être observé, ce qui indique qu'il n'y a pas d'attraction et par conséquent qu'il n'y a pas d'interactions non spécifiques entre bactéries et nanoparticules (figure III-5c). Dans une expérience témoin, afin de tester la spécificité de la sonde ciblant *E. coli* DH10β, l'autre souche bactérienne, *Acinetobacter sp.* ADP1. a été soumise au protocole d'hybridation avec la sonde *E. coli* biotinylée et à l'incubation avec les nanoparticules magnétiques. Le positionnement aléatoire de ces bactéries sur la matrice aimantée indique l'absence d'attraction vers les maxima de champ, ce qui signifie que la sonde ne s'est pas hybridée et confirme la spécificité du marquage des cellules (figure III-5d).

II-3. Micromanipulation des cellules bactériennes marquées magnétiquement

II-3-1. Expérience de tri cellulaire

Un mélange de cellules d'*Escherichia coli* DH10β et d'*Acinetobacter sp.* ADP1 comportant 0,05 % de cellules cibles a été soumis au protocole d'hybridation *in situ* magnétique. Ce mélange de cellules, dénommé « fraction 1 » a été injecté dans le canal microfluidique circulant au-dessus du réseau de micro-aimants avant rinçage avec de l'eau distillée. La suspension récupérée a été dénommée fraction 2. Les cellules qui ont pu être attirées et bloquées sur le réseau de micro-aimants ont ensuite été éluées en augmentant significativement la vitesse du flux dans le microcanal, cet éluat constituant la « fraction 3 ».

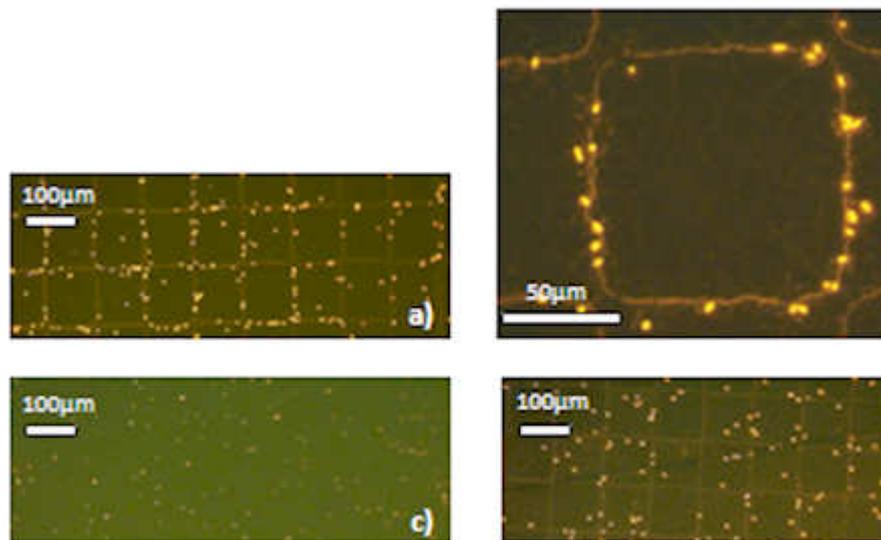


Figure III-5. a) Cellules d'*E. coli* attirées sur un réseau de micro-aimants (motifs carrés de 100x100 µm). B) Image agrandie de cellules *E. coli* attirées. c) Expérience témoin: quand un mélange de bactéries et de nanoparticules superparamagnétiques est placé au-dessus de la matrice magnétique, les bactéries sont dispersées de façon aléatoire. d) Contrôle négatif montrant que l'attraction d'*Acinetobacter sp. ADP1* n'était pas possible avec la sonde utilisée, ce qui confirme la spécificité.

L'état du microcanal durant les différentes étapes de la séparation a été observé au microscope à épifluorescence. Les résultats de ces observations sont présentés sur la figure III-6. La fluorescence orange est liée au marquage préalable des bactéries par du BET. Une attraction de bactéries sur le réseau de micro-aimants (figure III-6b et III-6c) peut être observée grâce à l'apparition de structures fluorescentes de 100x100 µm correspondant à la forme des motifs magnétiques. Après élution, ces motifs disparaissent (figure III-6d) et le canal retrouve son état initial (figure III-6a). Ce résultat traduit *a priori* le fait que l'augmentation du flux permet le décrochage des cellules préalablement attirées et retenues et leur récupération dans la fraction 3, résultat requérant cependant confirmation ou infirmation.

II-3-2. Identification et quantification des bactéries dans les différentes fractions de tri

L'identification et la quantification des bactéries dans les différentes fractions de tri ont été réalisées par PCR quantitative. Pour cela, des séquences spécifiques de chacune des bactéries ont été définies dans deux gènes distincts. Ces gènes devaient être présents en simple copie dans le génome de façon à pouvoir corréler le nombre de gènes détectés au nombre de cellules de chacune des 2 bactéries. De plus, pour permettre une identification des bactéries, chaque gène devait être spécifiquement représenté sur une seule d'entre elles. En suivant cette démarche, nous avons donc choisi pour *Escherichia coli* DH10β le gène *recE* et pour *Acinetobacter sp.* ADP1 le gène *recA*, du fait que la souche *Escherichia coli* DH10β en a été déléetée. Les résultats de ces expérimentations sont présentés sur le graphique figure III-7. Les concentrations d'*Escherichia coli* DH10β mesurées au sein du mélange bactérien initial (fraction 1) sont conformes (0,04 %) à ce qui était attendu (0,05 %). La grande pureté de la fraction 2 (99,9 % des bactéries non cibles récupérées après passage du mélange dans le système microfluidique) confirme la spécificité tant de l'hybridation que de l'attraction qui n'a pas retenu les cellules d'*Acinetobacter sp.* ADP1 alors que les bactéries cibles marquées magnétiquement sont très efficacement attirées par les micro-aimants. Après élution (fraction 3), le pourcentage de bactéries cibles récupérées confirme les résultats de la visualisation puisque les cellules *Escherichia coli* DH10β constituent 99,9 % du mélange final. Les résultats des expériences de quantification montrent cependant des taux de récupération des cellules cibles ou non cibles faibles. Le nombre de cellules d'*Acinetobacter sp.* ADP1 dans la fraction 2 (après élution sous flux modéré) ne correspond qu'à 25 % du nombre de cellules de cette souche dans la fraction 1. Des valeurs similaires (~50 %) ont été obtenues pour *Escherichia coli* DH10β entre les fractions 3 (élution sous flux élevé) et 1. Ces résultats pourraient indiquer que des phénomènes d'adsorption non spécifique des cellules au niveau des parois du dispositif contribuent à retenir une fraction significative de ces objets biologiques à l'intérieur du système. Ces phénomènes d'adsorption cellulaire pourraient être limités par l'utilisation d'agents de passivation tels que la sérum-albumine bovine (BSA) qui, ajoutée à la suspension bactérienne contribuerait à diminuer l'adhérence des cellules aux parois comme cela a déjà été montré dans d'autres structures fluidiques²¹⁸.

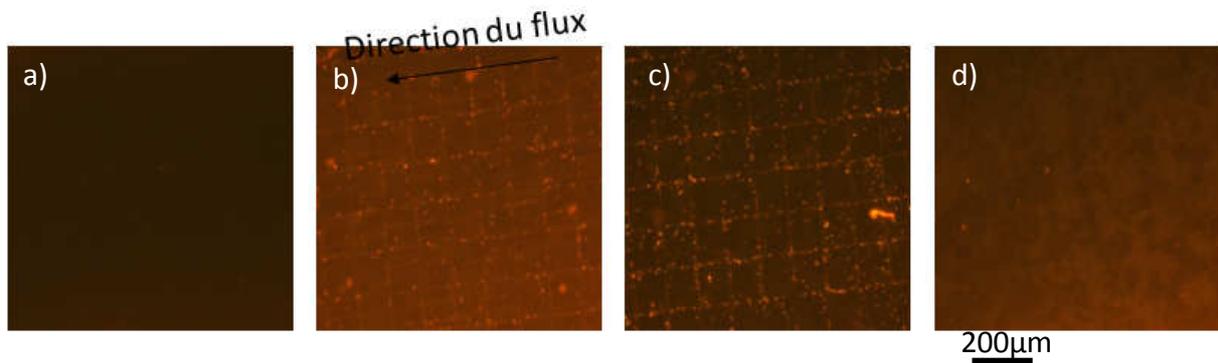


Figure III-6. Etat du canal microfluidique parcourant la surface magnétique au cours du tri cellulaire. (a) avant injection du mélange ; (b) pendant que la séparation s'effectue, (c) après passage de l'intégralité du mélange dans le canal et (d) après élution des bactéries retenues sur le réseau de micro-aimants.

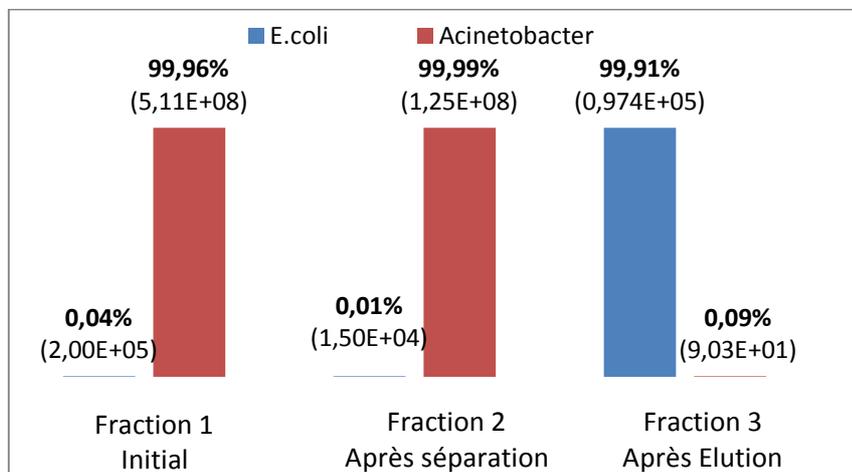


Figure III-7. Identification et quantification des bactéries dans les différentes fractions de tri

III) DISCUSSION

Au chapitre précédent, nous avons présenté un micro-système de tri magnétique fondé sur l'intégration de micro-aimants permanents dans un canal microfluidique. Dans ce chapitre nous décrivons la première étape de la mise en œuvre de ce système pour trier des cellules bactériennes marquées magnétiquement. L'aboutissement de cette étude aura pour ambition d'intégrer cet outil dans un contexte de recherche plus général en microbiologie environnementale, l'étude la plus exhaustive possible de la diversité bactérienne en complément des méthodes traditionnelles basées sur la culture et la métagénomique. Pour cela la stratégie suivie a été de privilégier l'hybridation moléculaire pour reconnaître des cellules bactériennes sur des critères taxonomiques. Elle s'est poursuivie par la mise en œuvre d'une technologie spécifique dans laquelle le complexe cibles-sondes pouvait être marqué par des nanoparticules magnétiques sans pénétration de ces nano-objets dans les cellules contournant ainsi les problèmes de perméabilisation des enveloppes cellulaires. Enfin, cette stratégie nécessitait le développement de micro-aimants et d'un système microfluidique adapté au tri cellulaire et à la récupération spécifique des différentes fractions cellulaires, marquées et non marquées.

III-1. Marquage magnétique des cellules bactériennes

III-1-1. Concept de « magnetic probe based cell fishing »

Le marquage magnétique des cellules bactériennes d'intérêt a été établi en s'appuyant sur le concept de « magnetic probe based cell fishing » qui consiste à réaliser une hybridation *in situ* avec des sondes polyribonucléotidiques biotinylées pour ensuite marquer magnétiquement les cellules cibles après incubation avec des nanoparticules superparamagnétiques recouvertes de streptavidine.

Le processus permettant d'établir ce type de marquage a été développé en 2003 par Zwirgmaier *et al.*¹³⁹. Les auteurs démontrent qu'en raison de la perméabilité limitée des enveloppes cellulaires au cours des processus d'hybridation *in situ*, seule une partie de la sonde est liée à son site cible intracellulaire, la partie restante se trouvant à l'extérieur de la cellule. Ce fragment de sonde resté à l'extérieur de la cellule va s'apparier spécifiquement avec d'autres molécules de sondes polyribonucléotidiques libres du fait de structures secondaires qui vont s'enchevêtrer les unes aux autres pour former un réseau à la périphérie des cellules. Ces sondes polyribonucléotidiques biotinylées peuvent alors être marquées avec des nanoparticules magnétiques recouvertes de streptavidine qui se lient aux biotines des sondes et assurent ainsi un marquage magnétique des cellules. Les cellules marquées et non marquées peuvent alors être séparées dans un champ magnétique.

III-2. Site cible et spécificité des sondes polyribonucléotidiques

Les sondes polynucléotidiques utilisées pour les hybridations *in situ* étaient des transcrits réalisés à partir de fragments PCR après amplification de l'ADN de la souche bactérienne cible *E.coli*. Le domaine III de la région hypervariable de l'ADNr 23S a été choisi pour l'amplification PCR du fait de sa valeur comme marqueur phylogénétique^{107,139}, permettant de générer une sonde pour la souche *E. coli* dont la spécificité vis-à-vis (au moins) de la seconde bactérie utilisée, *Acinetobacter*, a été établie par alignement de séquences et validée expérimentalement.

L'intérêt de cette approche basée sur une utilisation de sondes polyribonucléotidiques pourrait être sa sensibilité élevée, le réseau de sondes à l'extérieur de la cellule fournissant un nombre important de points d'ancrage des nanoparticules compensant ainsi un nombre limité de cibles à l'intérieur de la cellule. Cette option serait particulièrement importante avec des échantillons environnementaux¹³⁰ à l'intérieur desquels de nombreuses populations bactériennes survivent dans un stade physiologique très ralenti avec donc un nombre faible de ribosomes. En outre, si les sondes polyribonucléotidiques ont été ici utilisées pour cibler des cellules bactériennes sur des critères taxonomiques, leur utilisation sur d'autres types de molécules d'ARN permettrait le marquage des cellules sur d'autres critères, notamment fonctionnels, que les gènes concernés soient chromosomiques ou plasmidiques^{110,113}.

En revanche, la longueur des sondes (« poly »-ribonucléotidiques) imposée par la technique de marquage pourrait conduire à un niveau de spécificité limité alors que seuls des hybrides impliquant des sondes oligonucléotidiques de courte taille (15 bases) peuvent efficacement être déstabilisés par un nombre très limité de mésappariements. Dans la littérature, les travaux montrent toutefois qu'il est possible avec des sondes ciblant le domaine III de la région hypervariable de l'ADNr 23S de discriminer taxonomiquement des bactéries jusqu'au niveau du genre¹⁰⁷. Cependant, puisque la stabilité de l'hybridation entre la sonde et sa cible dépend fortement des conditions expérimentales, lorsque celles-ci sont soigneusement contrôlées il devient possible dans quelques cas d'établir une distinction au niveau de l'espèce bactérienne¹⁰⁸. Nos résultats montrent que la sonde *E. coli* utilisée dans les conditions expérimentales présentées dans la section « Matériels et Méthodes » permettait de différencier spécifiquement *E. coli* d'*Acinetobacter sp.*

III-3. *Tri des cellules bactériennes marquées magnétiquement*

Après avoir marqué magnétiquement des cellules bactériennes d'intérêt, l'objectif était d'évaluer la capacité du microsystème de tri magnétique à pouvoir trier ces cellules à partir d'un mélange cellulaire complexe. Pour y parvenir nous avons travaillé avec un mélange de cellules bactériennes comprenant la souche cible (*Escherichia coli* DH10 β) et la souche non cible (*Acinetobacter sp.* ADP1). Pour apprécier la capacité du dispositif de tri à isoler des cellules cibles présentes en très faible abondance, une suspension constituée de 0,04 % de cellules cibles pour 99,96 % de non cibles a été réalisée et analysée après hybridation et marquage par les nanoparticules.

III-4. *Performances du système de tri*

Selon la littérature^{195,219}, les performances d'un dispositif de tri peuvent être jugées selon trois critères : le taux de récupération, la pureté et le débit de tri.

III-4-1. *Taux de récupération*

Le taux de récupération aussi dénommé efficacité de séparation est le nombre de cellules cibles récupérées à l'issue du tri par rapport au nombre de ces mêmes cellules présentes dans le mélange initial. Ce taux de récupération est d'abord conditionné par l'efficacité du marquage (capacité à marquer exhaustivement les cellules bactériennes cibles) puis dans un second temps par la capacité de la matrice magnétique à attirer et maintenir les cellules cibles. Le taux de récupération des cellules d'*E. coli* obtenu avec le système microfluidique développé ici est de 50 %.

III-4-2. *Pureté*

La pureté caractérise le pourcentage de cellules cibles isolées par rapport aux cellules non cibles. Le taux de pureté obtenu de 99,96 % indique qu'en dépit d'un très fort déséquilibre initial entre les niveaux populationnels des deux souches bactériennes au détriment de la souche cible le procédé a permis d'éliminer quasiment totalement les cellules non cibles (taux de contamination de 0,04 %) pour proposer une suspension fortement enrichie en cellules cibles. Ces valeurs sont extrêmement encourageantes dans la perspective d'une application à des communautés bactériennes environnementales composées d'un nombre très élevé de populations différentes, représentées pour la quasi-totalité par un nombre très limité de cellules.

III-4-3. Débit de tri

Le débit représente le nombre de cellules qui passent à travers la zone de séparation par unité de temps. Ce paramètre dépend principalement de la vitesse d'écoulement du fluide commandée par le contrôleur fluide. Cependant, la pureté et le taux de récupération pourront être considérablement diminués avec une augmentation significative de la vitesse d'écoulement du fluide. Les premiers développements ont abouti à un système dans lequel 25 μl du mélange cellulaire initial composé de $5,1 \cdot 10^8$ bactéries transitent en 25 minutes (débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$) à travers le système, ce qui se traduit par un débit cellulaire de 10^9 bactéries par heure.

Les performances du système développé dans cette étude incluent un taux de récupération de 50 %, une pureté de 99,96 % et un débit de tri de 10^9 bactéries par heure. Ces données peuvent être comparées avec celles obtenues par Stoffels *et al.* dans leurs travaux publiés en 1999¹³⁸ montrant que des bactéries marquées magnétiquement après hybridation sont séparées par un procédé de tri magnétique macroscopique, le système MACS®. Le point principal à souligner concerne l'intérêt de l'emploi des micro-systèmes de tri magnétique pour accroître les forces d'attraction. Il convient de rappeler que la miniaturisation des sources de champ magnétique augmente considérablement les gradients de champs qui deviennent alors extrêmement performants pour réaliser l'attraction cellulaire (cf. chapitre I et II). L'utilisation d'un système macroscopique peut limiter considérablement l'attraction de cellules marquées magnétiquement, comme le soulignent Stoffels *et al.* Ces auteurs rapportent des taux de récupération faibles (~10 %) et des niveaux de pureté très variables, fortement influencés par la concentration initiale de bactéries cibles, et attribuent ces performances aux limites physiques de la colonne de séparation du système MACS®. Les performances obtenues dans cette étude se sont notamment avérées limitées dans les situations où les cellules cibles étaient en faible abondance dans la suspension initiale (~6 %), le taux de pureté variant entre 60 et 85 %. Pour une application en microbiologie environnementale avec les objectifs présentés plus haut, le système microfluidique développé ici semble donc très prometteur, par comparaison aux systèmes de tri macroscopiques. On peut par ailleurs estimer que le potentiel de capture des bactéries du système développé ici est encore perfectible et qu'il bénéficiera de la nouvelle génération de micro-aimants plats permanents actuellement en développement à l'Institut Néel, qui devraient permettre d'augmenter la portée de la force d'attraction via l'augmentation de l'épaisseur des micro-aimants (micro-aimants plats obtenus par structuration topologique puis planarisation ou micro-aimants TMP avec une augmentation de la profondeur de retournement de l'aimantation). On peut estimer que l'attraction sera alors efficace sur l'ensemble du volume du microcanal, notamment dans les parties supérieures les plus éloignées des micro-aimants. Ces optimisations devraient contribuer à accroître la sensibilité du système et notamment permettre d'isoler des cellules cibles diluées en très fortes proportions dans la suspension cellulaire.

Ces innovations technologiques pourront également se combiner avec le développement de micro-aimants de dimensions encore réduites dont certains sont déjà disponibles (7,5 x 7,5 µm), qui vont permettre d'accroître les performances en termes de résolution, les cellules bactériennes marquées magnétiquement pouvant être alors attirées et isolées séparément les unes des autres. Cette propriété pourrait alors être exploitée pour raffiner l'étude des différentes populations bactériennes attirées sur les micro-aimants en fonction de la spécificité de la sonde utilisée. Idéalement, chaque cellule pourrait être traitée indépendamment soit pour une mise en culture soit pour l'extraction de son patrimoine génétique et son analyse, ce qui correspond au concept de « single-cell genomics ». Les premières expérimentations réalisées avec ces nouveaux aimants confirment ces perspectives et sont donc très encourageantes (cf. figure III.8) pour l'étude des systèmes biologiques complexes^{220,221}.

III-1. *Justification du potentiel d'application du système*

Dans un contexte de microbiologie environnementale et d'exploration de la diversité bactérienne, la capacité d'un système de tri à isoler des cellules faiblement représentées au sein d'un échantillon est un atout indéniable. Des données récentes, notamment issues de la métagénomique, montrent que la structuration des communautés bactériennes dans des environnements aussi complexes et hétérogènes que les sols repose sur un nombre extrêmement élevé de populations présentant de très faibles effectifs. C'est notamment ce très haut niveau de diversité et cette répartition hétérogène qui limite le potentiel de la métagénomique et du séquençage haut débit à appréhender cette biosphère rare. Pouvoir cibler grâce au tri en microfluidique certaines de ces populations sur des critères taxonomiques et à plus long terme sur des critères fonctionnels constitue donc une avancée technologique significative pour le décryptage de la biodiversité bactérienne sachant que ces populations pourront être étudiées grâce aux outils et concepts de la génomique sur cellule isolée¹⁴⁹. Les perspectives concernent aussi bien le domaine fondamental et la nécessité d'un inventaire taxonomique et fonctionnel pour comprendre par exemple les potentialités adaptatives du monde bactérien que celui plus appliqué cherchant à exploiter industriellement les propriétés fonctionnelles des microbes notamment celles restées ignorées jusqu'à présent du fait de la récalcitrance de la grande majorité des espèces bactériennes à être cultivées *in vitro*²²².

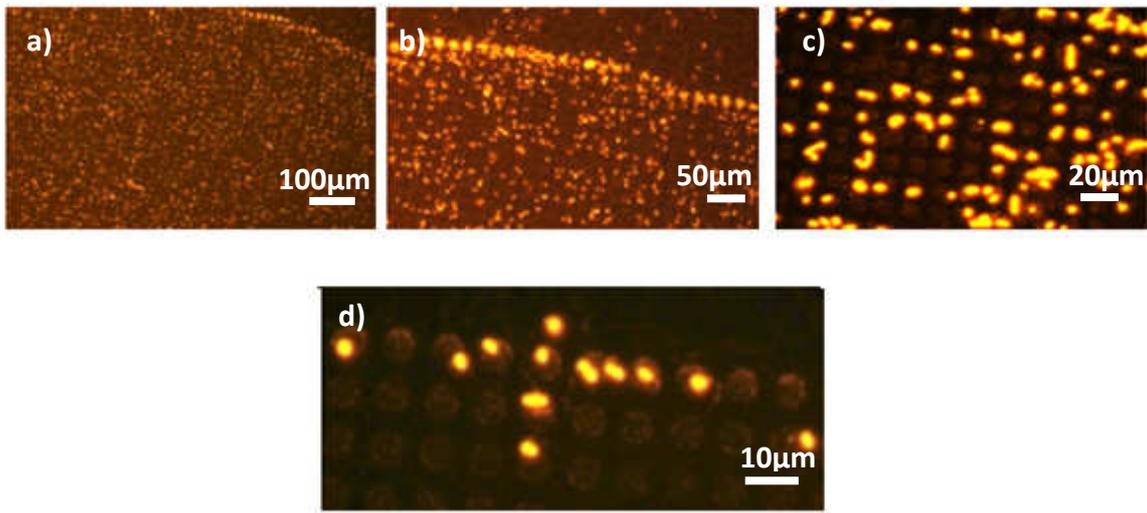


Figure III-8. Zoom progressif montrant les cellules *E. coli* piégées individuellement sur un réseau de micro-aimants comportant des motifs carrés de $7,5 \times 7,5 \mu\text{m}$ (a, b, c, d).

**CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE
MARQUAGE DE L'ADN PAR DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES
POUR ETUDIER LES TRANSFERTS HORIZONTALS DE GENES CHEZ LES
BACTERIES**

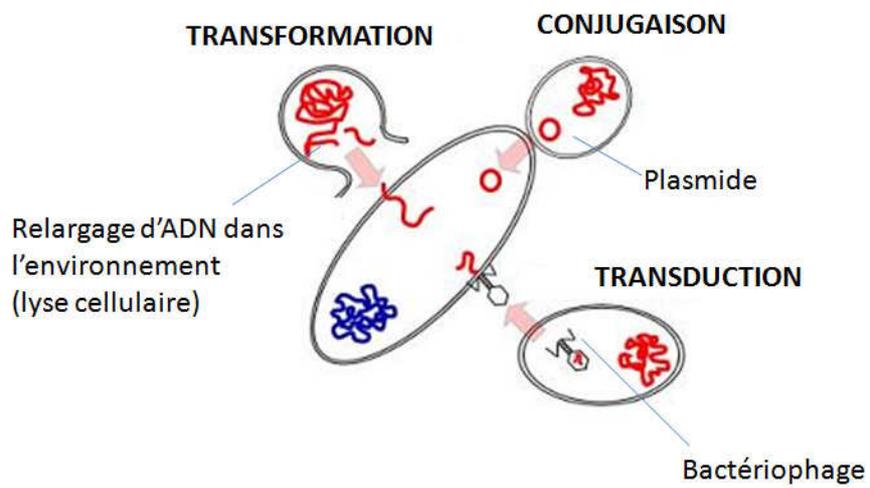


Figure IV-1. Mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries

INTRODUCTION

Le transfert horizontal de gènes chez les procaryotes regroupe une série de mécanismes extrêmement importants concernant le potentiel adaptatif et évolutif de ces organismes et a été largement étudié^{223,224,225}. En permettant l'acquisition de nouveaux gènes, les fonctions associées à ces gènes vont pouvoir conférer aux bactéries réceptrices, dans un certain nombre de cas, une capacité d'adaptation accrue à de nouvelles conditions environnementales. Cet échange latéral de gènes, au centre des processus d'adaptation et d'évolution bactérienne peut avoir des conséquences favorables pour l'homme et son environnement quand il permet la dégradation de composés xénobiotiques toxiques²²⁶ ou plus gênants quand il concerne la diffusion chez les pathogènes humains ou animaux de gènes de résistances à des antibiotiques²²⁷. Ces implications justifient les très nombreux travaux consacrés à l'étude de ces mécanismes²²⁸⁻²³¹ considérant que c'est par leur compréhension qu'il pourrait être possible d'en contrôler et moduler les effets, que ceux-ci soient positifs ou négatifs comme dans le cas de la dispersion de gènes de résistance à des antibiotiques.

Trois mécanismes de transferts horizontaux de gènes sont actuellement connus (figure IV-1) : i) le transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique²³² (la conjugaison), ii) le transfert d'ADN libre, nu dans l'environnement²³³ (la transformation) et iii) le transfert d'ADN médié par des bactériophages²³⁴ (la transduction). Traditionnellement, ces transferts horizontaux de gènes ont été étudiés sur des isolats bactériens, ce qui a permis d'en décrypter les mécanismes moléculaires impliqués et ce aussi bien pour la transformation, la transduction que la conjugaison. Pour aborder l'importance évolutive et adaptative de ces mécanismes, l'étude écologique a également été développée sur des isolats (restreinte donc aux seuls organismes répondant aux approches culturelles) où les bactéries réceptrices d'un gène étaient sélectionnées *in vitro* sur un milieu de culture²³⁵. Ce milieu de culture était généralement sélectif, ce qui permettait le développement de certains types de bactéries comme celles ayant acquis un ou des gènes de résistance à des antibiotiques ou bien conférant la capacité à dégrader des polluants environnementaux. Cependant, ces travaux, très fondamentaux, réalisés sur quelques bactéries modèles largement étudiées dans les laboratoires restent insuffisants pour permettre de comprendre comment sont régulés les transferts d'information génétique dans l'environnement. Cette approche ne concerne en effet que les bactéries dites « cultivables » qui ne représentent que 1 % de la flore bactérienne totale dans de nombreux environnements.

En alternative, la métagénomique offre la possibilité de contourner le biais de la culture pour étudier les transferts horizontaux de gènes. Dans ce cas, à partir de l'ensemble des ADN extraits, la comparaison des génomes par analyse bioinformatique peut mettre en évidence des phénomènes de transferts entre différentes espèces. Par exemple, des gènes étrangers dans un génome sont identifiés du fait de leur composition nucléotidique atypique (un taux de GC % anormal par rapport au reste du génome par exemple)^{226,236}.

Cette approche bioinformatique nécessite toutefois de pouvoir reconstituer des génomes bactériens à partir des séquences métagénomiques, (ce qui est rarement le cas) de façon à pouvoir réaliser ces travaux de génomique. L'analyse bioinformatique ne permet pas non plus de dater les événements de transfert, ni leurs fréquences et n'apporte pas d'informations sur la façon dont ils sont régulés *in situ* tant par les paramètres abiotiques du milieu que par la physiologie des bactéries.

Approches liées à la culture et métagénomiques restent donc assez peu performantes pour étudier la régulation du transfert d'ADN *in situ*, les microorganismes tant donateurs que récepteurs impliqués, les mécanismes mis en jeu, les fréquences associées et l'impact sur le potentiel adaptatif. Des approches alternatives ont été développées consistant à marquer les éléments génétiques dont on veut étudier le transfert avec un gène codant une protéine naturellement fluorescente comme la *green fluorescent protein* (gfp) ou ses dérivés, utilisant des artifices permettant de réprimer l'expression du gène dans la bactérie donatrice^{145,237}. Les cellules transconjugantes ou transformantes fluorescentes peuvent alors être séparées physiquement des autres cellules non fluorescentes et spécifiquement récupérées grâce à des appareils trieurs de cellules, les cytomètres en flux²³⁸. Le développement de ces approches a alors ouvert des perspectives totalement innovantes permettant d'étudier ces bactéries quel que soit leur statut physiologique en rapport avec la culture *in vitro*. Toutefois, en ce qui concerne un environnement complexe comme le sol par exemple, les principales limitations à l'application de ces techniques tiennent à l'utilisation de la fluorescence dont l'efficacité est limitée par l'auto-fluorescence naturelle de certaines bactéries et de certains constituants du sol^{181,182}. De plus, les technologies pour trier les cellules fluorescentes ne peuvent opérer efficacement avec les bactéries extraites du sol, associées et en général fortement fixées à la matrice organo-minérale²³⁹. Enfin, l'expression de la fluorescence peut être limitée dans certaines bactéries phylétiquement éloignées de la souche donatrice (compatibilité des promoteurs).

Nous proposons ici un développement méthodologique basé sur les nouvelles propriétés magnétiques de cellules après qu'elles aient acquis un fragment d'ADN par transfert horizontal de gènes afin de les isoler du reste de la communauté et de les récupérer spécifiquement grâce à l'emploi de micro-aimants adaptés (figure IV-2). Le principe consiste à marquer *in vitro* l'ADN bactérien à transférer avec des nanoparticules magnétiques (figure IV-2a) de façon à conférer ces propriétés aux cellules bactériennes ayant acquis cet ADN par transfert latéral. Cette technologie pourrait être applicable pour récupérer spécifiquement les bactéries de la microflore indigène d'un environnement ayant été transformées génétiquement par ces molécules d'ADN marquées en vue de les identifier et de décrypter totalement leur génome par séquençage afin d'élucider les mécanismes génétiques impliqués dans le processus de transfert de l'ADN (figure IV-2b).

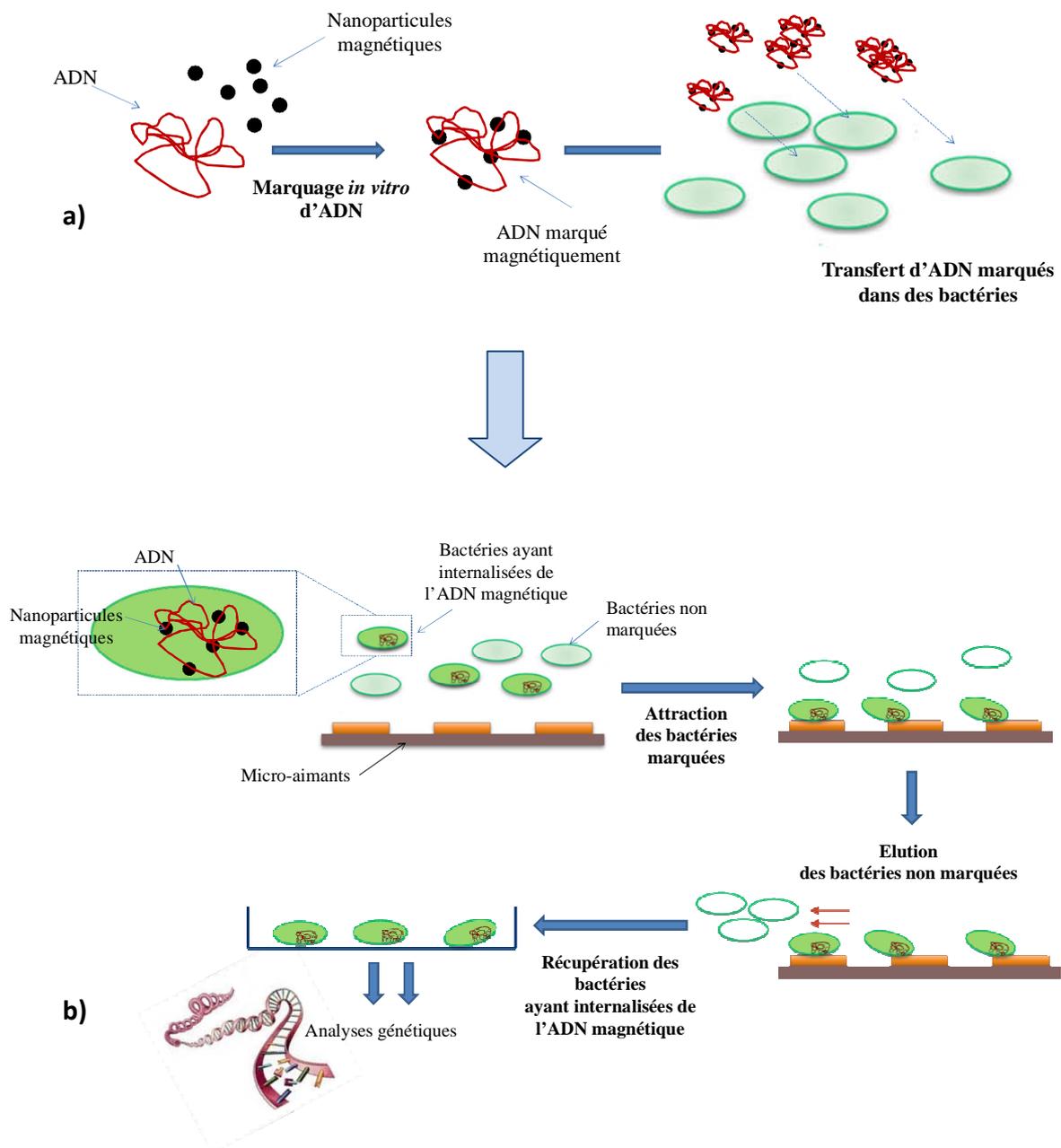


Figure IV-2. Représentation schématique du principe d'étude des transferts horizontaux de gènes après marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques. a) Marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques. b) Principe de micromanipulation des bactéries transformées génétiquement et marquées magnétiquement.

La première étape d'un tel projet a donc consisté à greffer *in vitro* des nanoparticules sur des molécules d'ADN plasmidique, principaux vecteurs du flux de gènes dans le monde bactérien. La seconde étape a consisté à internaliser ces molécules d'ADN marquées dans des bactéries modèles afin d'évaluer la capacité d'attraction des bactéries ainsi marquées magnétiquement sur un réseau de micro-aimants.

I) MATÉRIELS ET MÉTHODES

I-1. Matériels de travail

I-1-1. Nanoparticules magnétiques

Quatre lots de nanoparticules magnétiques différents ont été utilisés pour cette étude. Le premier, obtenu chez Ocean NanoTech® était un lot de nanoparticules magnétiques de 20 nm de diamètre recouvertes en surface par des fonctions acides carboxyliques (-COOH) (Iron oxide nanocrystals with carboxylic acid group, 20 nm, [Fe]=5 mg/ml). Le second lot, obtenu chez Ademtech® était un lot de nanoparticules magnétiques de 100 nm de diamètre également recouvertes en surface de fonctions acides carboxyliques (Carboxyl-Adembeads 100nm ; [nanoparticules]=5 mg/ml). Le troisième lot, obtenu chez Miltenyi Biotec® était un lot de nanoparticules magnétiques de 50 nm de diamètre recouvertes en surface de molécules de streptavidine (Streptavidin MicroBeads 50 nm ; concentration non communiquée par le fabricant). Le quatrième lot, obtenu chez Nanocs® était un lot de nanoparticules magnétiques de 30 nm de diamètre recouvertes en surface de molécules de streptavidine (Magnetic Nanoparticles, Streptavidin/Avidin Labeled 25-30 nm ; [Fe]=5 mg/ml).

I-1-2. Souches bactériennes

La souche bactérienne utilisée dans cette étude était *Escherichia coli* DH5 α . Elle a été cultivée dans du milieu Luria-Bertani (LB) liquide à 37°C, pendant la nuit et sous agitation.

I-1-3. Plasmides utilisés et méthodes de préparation.

Deux plasmides ont été utilisés dans cette étude :

- Le plasmide pEGFP-C1 (Clontech®) de 4,7kb possédant le gène *egfp*, codant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) et deux gènes de résistance à des antibiotiques, la kanamycine et la néomycine. Ce plasmide a été maintenu dans une souche d'*Escherichia coli* DH5 α cultivée sur milieu Luria-Bertani (LB) agar supplémenté de 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de kanamycine et de 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de néomycine puis extrait, selon les besoins, à l'aide du kit d'extraction plasmidique NucleoSpin® Plasmid Extraction de Macherey Nagel.

- Le plasmide pBln de 8,5kb possédant le gène *linA* (dont le produit d'expression est impliqué dans la première étape de la dégradation du lindane) et deux gènes de résistance à des antibiotiques, la kanamycine et la tétracycline. Ce plasmide a été construit à partir du plasmide à large spectre d'hôte pBBR1-MCS3 (GeneBank ref: XXU25059), capable de se répliquer dans de nombreux groupes bactériens²⁴⁰, dans lequel a été inséré le gène *linA* de *Sphingobium francense*²⁴¹ et le gène *nptII* (résistance à la kanamycine). Il a également été maintenu dans une souche d'*Escherichia coli* DH5 α cultivée sur milieu Luria-Bertani (LB) agar supplémenté de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de kanamycine et de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de tétracycline puis extrait, selon les besoins, à l'aide du kit d'extraction plasmidique NucleoSpin® Plasmid Extraction de Macherey Nagel.

I-1-4. Les micro-aimants

Les micro-aimants utilisés (100 x 100 μm) étaient identiques à ceux décrits dans les chapitres II et III. Se référer à l'annexe I en fin de manuscrit pour plus de détails.

I-2. Interaction nanoparticules/bactéries

I-2-1. Adsorption des nanoparticules sur les bactéries

Un volume de 5 μl de chaque type de nanoparticules magnétiques a été mélangé à 50 μl de milieu LB liquide contenant une culture d'*Escherichia coli* DH5 α en phase stationnaire de croissance (Densité Optique à 600 nm = 2) et incubé 1 h à 37°C. Un volume de 1 μl de bromure d'éthidium (0,1 mg/ml) a été ajouté au mélange puis 5 μl de la solution ont été déposés sur un réseau de micro-aimants. Les bactéries à la surface du réseau de micro-aimants ont été observées avec un microscope à épifluorescence avec un filtre correspondant aux longueurs d'ondes d'émission et d'excitation du bromure d'éthidium (BET) (524/605 nm).

I-2-2. Toxicité des nanoparticules

La toxicité potentielle des nanoparticules magnétiques de 100 nm de diamètre recouvertes en surface par des fonctions acides carboxyliques (Ademtech®) et des nanoparticules magnétiques de 50 nm de diamètre et recouvertes en surface par des molécules de streptavidine (Miltenyi Biotec®) a été évaluée par un test d'inhibition de la croissance bactérienne sur *Escherichia coli* DH5 α . Trente millions de cellules bactériennes ($\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0,8$) ont été disposées en microplaques 96 puits dans 100 μl de milieu LB liquide. Pour les nanoparticules de 50 nm de diamètre et recouvertes en surface par des molécules de streptavidine (Miltenyi Biotec®), les différents puits ont été additionnés de différents volumes de nanoparticules : 1, 2, 5 et 10 μl . Un témoin positif comprenant la culture bactérienne seule et un témoin négatif (milieu seul) ont été réalisés. Pour les nanoparticules de 100 nm de diamètre recouvertes en surface par des fonctions acides carboxyliques (Ademtech®), les différents puits ont été additionnés de différents volumes de nanoparticules de manière à obtenir des concentrations finales de 0,001 ; 0,01 ; 0,1 et 1 mg/ml.

Les microplaques ont été incubées 24 heures à 37°C sous agitation. Une mesure de D.O_{600nm} a été, à terme, réalisée pour chaque traitement. Chaque essai a été réalisé en triplicats et les différences entre les moyennes de chaque échantillon ont été déterminées par le Test T-Student.

I-3. Marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques

Pour cette étape, deux types de marquage ont été envisagés. Le premier consistait à un marquage total du plasmide. Le second consistait à un marquage localisé.

I-3-1. Marquage total

Le marquage total a été réalisé sur le plasmide pBln décrit ci-dessus. La liaison entre ces plasmides et des nanoparticules a été réalisée à l'aide de deux liaisons chimiques, la liaison amide (impliquant une réaction entre une fonction amine et une fonction carboxyle) et la liaison biotine-streptavidine, requérant dans un premier temps d'ajouter aux plasmides des fonctions amines ou biotines. Lorsque les plasmides étaient fonctionnalisés par des amines, le couplage chimique plasmides-nanoparticules a pu être établi par liaison amide en utilisant les nanoparticules magnétiques de 100 nm de diamètre recouvertes en surface par des fonctions acides carboxyliques (Ademtech®). Lorsque les plasmides étaient fonctionnalisés par des biotines, le couplage chimique plasmide-nanoparticules a pu être établi par liaison biotine-streptavidine en utilisant les nanoparticules magnétiques de 50 nm de diamètre recouvertes en surface par des molécules de streptavidine (Miltenyi Biotec®).

I-3-1-1. Fonctionnalisation des plasmides

> Fonctionnalisation des plasmides par des amines (-NH₂) :

Les plasmides ont été fonctionnalisés avec des fonctions amines à l'aide du kit MIRUS Label IT® amine Nucleic Acid Labeling Kits en suivant les recommandations du fabricant.

> Fonctionnalisation des plasmides par des biotines :

Les plasmides ont été fonctionnalisés avec des fonctions biotines à l'aide du kit MIRUS Label IT® biotine Nucleic Acid Labeling Kits en suivant les recommandations du fabricant.

I-3-1-2. Couplage plasmides-nanoparticules

> Couplage plasmides-NH₂ / nanoparticules-COOH :

Pour réaliser ce couplage, les groupements carboxyles des nanoparticules ont d'abord été activés chimiquement par la méthode NHS / EDCI (carbodiimide). Une solution d'activation a été préparée en diluant 2 mg d'EDCI (1 - [3 - (diméthylamino) propyl]-3-éthylcarbodiimide méthiodide, Sigma-Aldrich) et 4 mg de NHS (N-hydroxysuccinimide) dans 500 µl d'eau distillée.

Ensuite, un volume de 20 µl de nanoparticules a été transféré dans un tube Eppendorf puis lavé. Pour cela, le tube contenant les nanoparticules a été placé à proximité d'un macro-aimant. Les nanoparticules magnétiques ont été attirées sur le côté du tube. Le tampon dans lequel elles étaient en suspension a été délicatement éliminé (à l'aide d'une pipette) et les nanoparticules remises en suspension dans 500 µl de tampon phosphate salin (PBS: 130mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.5M EDTA, pH7.2). Cette procédure a été répétée trois fois. A la dernière étape, les nanoparticules ont été remises en suspension avec la solution d'activation et incubées une nuit à 35°C sous agitation.

Les nanoparticules ainsi activées ont été lavées avec du tampon phosphate salin (PBS: 130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.5 M EDTA, pH 7.2) en suivant la procédure décrite précédemment. Lors du dernier lavage, les nanoparticules ont été remises en suspension dans 50 µl de tampon PBS. Cinquante microlitres de plasmides fonctionnalisés par des amines (100 ng/µl) ont alors été ajoutés à la solution de nanoparticules activées et le mélange incubé 12 h à 35 °C sous agitation.

> Couplage plasmide-biotine / nanoparticule-streptavidine :

Vingt-cinq microlitres de plasmides fonctionnalisés par des amines (100 ng/µl) ont été mélangés avec 5 µl de nanoparticules de 50 nm recouvertes de streptavidine (Miltenyi®)

I-3-2. Marquage localisé

Le marquage localisé a été réalisé sur le plasmide pEGFP-C1. La construction de ce marquage consistait en la ligation dans les plasmides d'un fragment de gène au préalable fonctionnalisé par des biotines. Un fragment d'ADN a donc d'abord été synthétisé, fonctionnalisé par des biotines en suivant le protocole établi puis cloné dans le plasmide pEGFP-C1. Les produits obtenus ont alors pu être marqués par des nanoparticules magnétiques recouvertes de streptavidine.

I-3-2-1. Amplification d'un fragment de gène

Un produit PCR du gène lacZ a été obtenu par amplification enzymatique sur un thermocycleur Biometra T-Gradient Labgene à partir du plasmide pCR®2.1-TOPO. Les amorces lacZEF (5'-GAAGATCTGCGCCCAATACGCAAACCGC-3') et lacZER (5'-TCCCCCGGGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGG-3'), possédant respectivement les sites de restriction enzymatique BglIII et SmaI aux extrémités 5', ont été utilisées pour obtenir un produit d'amplification de 691 pb. Le mélange PCR a été réalisé à l'aide du kit Illustra Hot Start Mix RTG PCR beads (GE Healthcare) avec 1,25 µl de chaque amorce (10mM), 21,5 µl d'eau ultra pure et 1 µl (25 ng) de plasmides pCR®2.1-TOPO. Les paramètres de cyclisation de la PCR ont été les suivants : 95 °C pendant 10 min, suivi de 34 cycles de 95 °C pendant 15 s, 54 °C pendant 30 s, et 72 °C pendant 1 min 30 s. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide des kits Illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit.

I-3-2-2. Clonage du fragment *lacZ* fonctionnalisé dans les plasmides

> Digestion enzymatique du fragment *lacZ* et du plasmide pEGFP-C1 :

Le plasmide pEGFP-C1 et le fragment *lacZ* possédant les deux sites de restriction cités plus haut ont été digérés séquentiellement par les deux enzymes correspondantes, *SmaI* et *BglII*. Dans la première digestion, 2 µl de tampon Tango (10X) (Fermentas), 1 µl d'ADN (1 µg) et 0,5 µl d'enzyme *SmaI* (Fermentas) ont été ajoutés à 16,5 µl d'eau ultra pure et incubés une nuit à 30 °C. Puis 2,5 µl de tampon Tango (10X) (Fermentas) et 0,5 µl d'enzyme *BglII* (Fermentas) ont été ajoutés au milieu réactionnel puis incubés de nouveau une nuit à 37 °C. Le plasmide a été déphosphorylé pendant 1 heure à 37°C après avoir ajouté 7,5 µl de tampon rAPid Phosphatase Alcaline (10X), 1 µl d'enzyme rAPid Phosphatase Alcaline (Roche) et 43,5 µl d'eau ultra pure au mélange réactionnel. L'ensemble des produits ont ensuite été purifiés à l'aide du kit Illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

> Fonctionnalisation biotine du fragment *lacZ* digéré :

Une partie des fragments *lacZ* digérés (100 ng) ont été fonctionnalisés avec de la biotine en utilisant la technologie Label IT ® (Nucleic Acid Labeling Kits - MIRUS) selon les recommandations du fabricant.

> Ligation du fragment *lacZ*(-biotine) dans le plasmide pEGFP-C1 :

Pour un volume de réaction de 20 µl, 1 µl de T4 DNA Ligase (fermentas), 2 µl de tampon T4 DNA ligase (10X) (fermentas), 100 ng de plasmide pEGFP-C1 déphosphorylé et 30 ng de fragment *lacZ* fonctionnalisé (molar ratio 2 :1 insert/vecteur) ont été mélangés puis incubés une nuit à 22°C. Des témoins de ligation entre des fragments *lacZ* non fonctionnalisés et des plasmides digérés ; de ligation entre plasmides digérés sans fragment insert ; de ligation entre fragments *lacZ* fonctionnalisés et de ligation entre fragments *lacZ* seuls ont été réalisés.

> Extraction des produits de ligation sur gel d'agarose :

Les produits de ligation d'intérêt ont été récupérés par extraction sur gel d'agarose (1 % p/v) coloré au bromure d'ethidium (BET) par le kit Illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) après migration électrophorétique des échantillons (100mV ; 20 min). Cela permettait de les isoler des autres entités réactives présentes dans l'échantillon. Finalement, le marquage des ADN avec les nanoparticules *streptavidine* (Miltenyi Biotec® ø50nm) a été réalisé.

I-3-2-3. Marquage plasmides-nanoparticules

La liaison plasmides-nanoparticules a été réalisée en incubant 2 h à température ambiante 5 µl de nanoparticules avec 25 µl de plasmides fonctionnalisés extraits du gel. Le témoin de marquage (ligation de fragment *lacZ* non fonctionnalisé avec des plasmides digérés) a été traité dans les mêmes conditions. Le greffage a été mis en évidence en comparant les migrations électrophorétiques de 25 µl des différents échantillons sur gel d'agarose (1 % p/v ; 100 mV ; 20 min) coloré au bromure d'éthidium (BET). Les gels ont été visualisés sur un transilluminateur UV 300 nm et photographiés par une caméra (Infinity cap).

I-4. Caractérisation des conjugués plasmides-nanoparticules

I-4-1. Migration sur gel d'agarose

Les marquages ont été mis en évidence en comparant les migrations électrophorétiques sur gel d'agarose (0,8 % p/v ; 100 mV ; 30 min) coloré au bromure d'éthidium (BET) des différents échantillons de plasmides marqués ou non par des nanoparticules magnétiques. Les gels ont été visualisés sur un transilluminateur UV 300 nm et photographiés par une caméra (Infinity cap). Des plasmides non fonctionnalisés, des plasmides non fonctionnalisés mis en présence de nanoparticules et des plasmides fonctionnalisés ont été traités dans les mêmes conditions.

I-4-2. Microscopie à force atomique (AFM)

Des plasmides marqués avec des nanoparticules et des plasmides seuls ont été déposés sur un substrat en mica fraîchement clivé. Après 5 min d'incubation, la surface a été lavée à cinq reprises consécutivement avec de l'eau distillée pour éliminer les sels et séchée à l'air pendant 15 minutes. Les observations AFM ont été conduites en mode semi contact sous un russe NT-MDT Ntegra microscope (Institut Néel, Grenoble⁵). La sonde cantilever en silicone (AC160TS Asylum Research Company) a été utilisée avec les paramètres suivants : cantilever rectangulaire (longueur: 160 µm, largeur 50 µm, épaisseur 4-5 µm), constante de rappel $k = 42\text{N} / \text{m}$, fréquence de résonance autour de 300 kHz, rayon de pointe: ~ 10 nm. L'amplitude de vibration de la sonde a été maintenue autour de 100 nm (typiquement 90 nm).

I-5. Purification des ADN marqués

Cette étape consistait à éliminer les nanoparticules n'ayant pas réagi avec les plasmides et qui restaient par conséquent libres en solution. Quatre méthodes ont été envisagées et testées. Pour des raisons abordées dans la partie « Résultats », l'ensemble des expérimentations suivantes ont été réalisées avec les plasmides marqués de manière totale.

⁵ Avec l'aide de Georgeta Ciuta

I-5-1. Par centrifugation sur filtre

La première méthode a été d'utiliser des filtres à centrifuger qui permettent de séparer les différents constituants du mélange en fonction de leur taille, les filtres permettant de retenir les plus grosses molécules (ADN marqué) et de laisser passer les plus petites (nanoparticules). Avant de choisir le type de filtre approprié, la taille du conjugué plasmides-nanoparticules et celle des nanoparticules seules ont été déterminées à l'aide d'un granulomètre (Zetasizer nano zs Malvern instruments). Des filtres à centrifuger (Vivacon®) avec une taille d'exclusion de 10^6 DA ont alors été choisis. Un volume de 500 μ l de conjugués plasmide-nanoparticules a été déposé dans l'un d'entre eux qui a été centrifugé 10 minutes à 10 000xg. Le filtrat a ensuite été soumis à une étape d'électrophorèse sur un gel d'agarose (0,8 % p/v ; 100 mV ; 20 min) coloré au bromure d'éthidium (BET). Les gels ont été visualisés sur un transilluminateur UV 300nm et photographiés par une caméra (Infinity cap).

I-5-2. Par chromatographie d'exclusion

Des colonnes de centrifugation contenant de la Sepharose 4B (Sigma-Aldrich) ont été générées en obstruant une seringue en plastique de 1 ml avec un filtre Millipore® de 0,2 μ m. Les seringues ont été remplies de Sepharose 4B puis soumises à centrifugation (1100xg pendant 5 min). Cette étape a été répétée jusqu'à ce que la seringue contienne environ 4 cm de gel. Un volume de 50 μ l de conjugué plasmides-nanoparticules a été déposé sur le gel de sépharose puis centrifugé selon une des 4 conditions suivantes : 1100, 1000, 500, 200 x g pendant 5 minutes. La fraction obtenue en sortie de colonne a été analysée par granulométrie (Zetasizer nano zs Malvern instruments).

I-5-3. Par extraction sur gel d'agarose

Un volume de 50 μ l de conjugué plasmides-nanoparticules a été déposé sur un gel d'agarose (0,8 % p/v) coloré au bromure d'éthidium et soumis à électrophorèse pendant 20 min à 100 mV. Les produits d'intérêt correspondant aux conjugués plasmides-nanoparticules ont ensuite été récupérés par extraction sur gel d'agarose par le kit Illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Après purification, les produits obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose (0,8 % p/v) coloré au bromure d'éthidium et soumis à une étape d'électrophorèse pendant 20 min à 100mV. Les gels ont été visualisés comme décrit précédemment.

I-5-4. Par purification sur colonne de silice

Un volume de 50 μ l de conjugués plasmides-nanoparticules a été purifié à l'aide du kit Illustra™GFX™PCR DNA Purification Kit (GE Healthcare). Un témoin de marquage, ADN non fonctionnalisés-nanoparticules, a été traité dans les mêmes conditions. Après purification, les produits obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose (0,8 % p/v) coloré au bromure d'éthidium et soumis à une étape d'électrophorèse pendant 20 min à 100 mV puis visualisés

sur un transilluminateur UV 300 nm et photographiés par une caméra (Infinity cap). Une mesure de susceptibilité magnétique a été réalisée avant et après purification sur les témoins marquage avec une balance magnétique (MSB AUTO, Sherwood Scientific Ltd).

I-6. Etude de l'accessibilité enzymatique des conjugués plasmides-nanoparticules

L'accessibilité enzymatique des conjugués a été évaluée par tentative d'amplification PCR d'un gène présent sur le conjugué plasmides-nanoparticules issu d'un marquage total. Le plasmide utilisé pour ce type de marquage était le plasmide pBln portant le gène *linA* dont une partie a été amplifiée par PCR. Les amorces utilisées étaient les amorces FGP *linA1* 5'-CGTAGACAAGCGCCAAGAGG-3' et FGP *linA2* 5'-GGTGAAATAGTTCGTGCATC-3' (Thomas *et al.* 1996²⁴²) pour obtenir un produit d'amplification de 320 pb. Le mélange PCR a été réalisé à l'aide du kit Illustra Hot Start Mix RTG PCR beads (GE Healthcare) avec 1,25 µl (10 mM) de chaque amorce, 21,5 µl d'eau ultra pure et 1 µl (10 ng) de conjugués plasmides-nanoparticules non purifiés. Les paramètres de cyclisation PCR ont été les suivants : 95°C pendant 10 min, suivi de 34 cycles de 95°C pendant 15 s, 58°C pendant 30 s, et 72 °C pendant 1 min 30 s. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide des kits Illustra™GFX™PCR DNA et Gel Band Purification Kit.

I-7. Internalisation des plasmides marqués dans les bactéries

Ces expérimentations ont été réalisées avec le conjugué plasmides-nanoparticules issu d'un marquage total et purifié sur colonne de silice. Pour internaliser ces conjugués, la méthode d'électroporation a été utilisée.

I-7-1. Electroporation

Les cellules d'*E.coli* DH5α ont été rendues électrocompétentes d'après le mode opératoire suivant : une colonie isolée fraîchement développée a été inoculée dans du milieu LB et incubée 1 nuit à 37 °C sous agitation de 150 rpm. Cette pré-culture a ensuite été diluée au 1/100ème dans le milieu LB pour être incubée à 37°C sous agitation de 150 rpm jusqu'à obtention d'une densité optique (DO) à 600 nm de 0.8. A partir de cette étape, les cellules bactériennes ont été maintenues dans de la glace. La culture bactérienne a été centrifugée à 4000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire lavé dans du glycérol 10 % pré-refroidi à 4°C. Les étapes de centrifugation / lavage ont été effectuées successivement 4 fois, avec un volume de glycérol 10 % froid de 1, ½ et 1/5ème du volume initial de la culture bactérienne. Les cellules ont été reprises dans un volume final de glycérol 10 % correspondant à 1/100ème du volume initial.

Pour l'électroporation, 5 μ l de conjugués plasmides-nanoparticules ont été mélangés à 50 μ l de cellules d'*E. Coli* DH5 α électrocompétentes dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm d'espacement puis soumis à un choc électrique (2.5 kV / cm 200 Ω et 25 μ F) dans un électroporateur (Gene Pulser II; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Des conditions expérimentales comprenant bactéries non électroporées en présence de plasmides marqués, bactéries non électroporées sans plasmide, bactéries électroporées sans plasmide et bactéries électroporées en présence de plasmides non marqués ont été réalisées. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 250 μ l de milieu SOC (2 % de tryptone, 0,5 % extrait de levure, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, glucose 20 mM) et incubées 30 min à 37 °C.

I-8. Attraction des bactéries transformées sur un réseau de micro-aimants

Après avoir internalisé les conjugués plasmides-nanoparticules dans les bactéries, 25 μ l de suspension de bactéries au préalable marquées au BET ont été déposés sur un réseau de microaimants. Après 20 minutes un microscope à épifluorescence (Carl ZeissAxioImager / AxioCam HSM caméra) a été utilisé pour observer à la surface de l'aimant l'apparition de motifs aimantés dessinés par les bactéries attirées magnétiquement.

II) RESULTATS

II-1. Adsorption des nanoparticules sur les bactéries

La première étape des travaux a consisté à vérifier que les nanoparticules magnétiques ne s'adsorbent pas de façon non spécifique sur la paroi des bactéries. Si tel était le cas, les bactéries pourraient être attirées par la surface aimantée alors que le développement de la technologie est basé sur l'attraction des seules bactéries ayant internalisé un ADN marqué sur les micro-aimants. Pour s'assurer de l'absence d'adsorption non spécifique, une solution comportant un mélange de bactéries et de nanoparticules est déposée sur un réseau de micro-aimants (damier 100x100 μ m).

En cas d'adsorption non spécifique des nanoparticules sur les bactéries, ces dernières sont piégées sur les micro-aimants aux endroits de plus hautes densités de flux magnétique, ce qui se traduit par l'apparition d'un motif en damier fluorescent. Dans ce cas, les nanoparticules ne peuvent alors être utilisées. Les résultats sont présentés sur les photographies des figures IV-3, IV-4, IV-5 et IV-6.

La figure IV-3 présente les résultats obtenus avec les nanoparticules de 20 nm de diamètre recouvertes de fonctions acides carboxyliques commercialisées par OceanTech®. En présence des nanoparticules (figure IV-3b), les bactéries s'alignent sur les zones aimantées dessinant les motifs en damier. Les nanoparticules interagissent donc de manière non spécifique avec les bactéries. Ce type de nanoparticules n'a pas été conservé pour la suite des expérimentations.

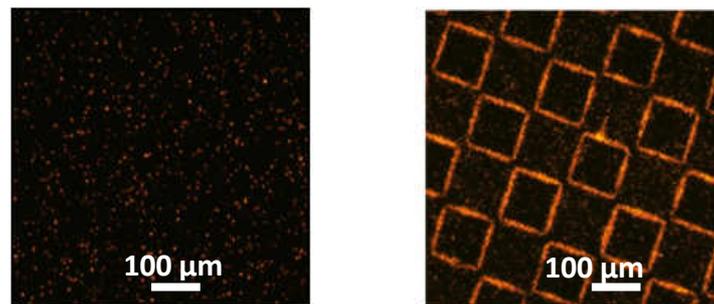


Figure IV-3. Interaction nanoparticules OceanTech® / bactéries. a) Bactéries seules sur réseau de micro-aimants ; b) Mix nanoparticules / bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 μm).

La figure IV-4 présente les résultats obtenus avec les nanoparticules de 100 nm de diamètre recouvertes de fonctions acides carboxyliques commercialisées par Ademtech®. La dispersion totale des bactéries en présence des nanoparticules (figure IV-4b) témoigne d'une non attraction des bactéries et par conséquent de l'absence d'interaction entre nanoparticules et bactéries. L'apparition de motifs fluorescents sur cette figure est liée à l'attraction des nanoparticules qui, n'étant pas fluorescentes, se lient au bromure d'ethidium pour produire la fluorescence observée. En dépit de cette observation, ces nanoparticules ont été conservées pour la suite des expériences.

La figure IV-5 présente les résultats obtenus avec les nanoparticules de 30 nm de diamètre recouvertes de molécules de streptavidine commercialisées par Nanocs®. En présence des nanoparticules (figure IV-5b), aucune attraction de bactéries n'a été observée. Cependant, des problèmes en termes de disponibilité de ce type de nanoparticules chez le fabricant nous ont contraints à ne pas poursuivre les expérimentations avec ce matériel.

Enfin, la figure IV-6 présente les résultats obtenus avec les nanoparticules en provenance de Miltenyi Biotech®. En présence des nanoparticules, les bactéries ne sont pas attirées sur le réseau aimanté (figure IV-6b). Ces nanoparticules ont donc également été conservées pour la suite des expériences.

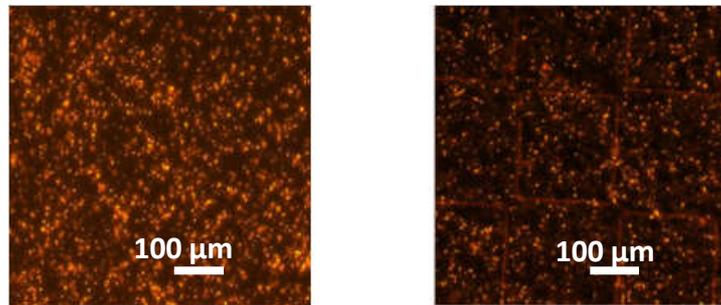


Figure IV-4. Interaction nanoparticules Ademtech® / bactéries. a) Bactéries seules sur réseau de micro-aimants ; b) Mix nanoparticules / bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 µm).

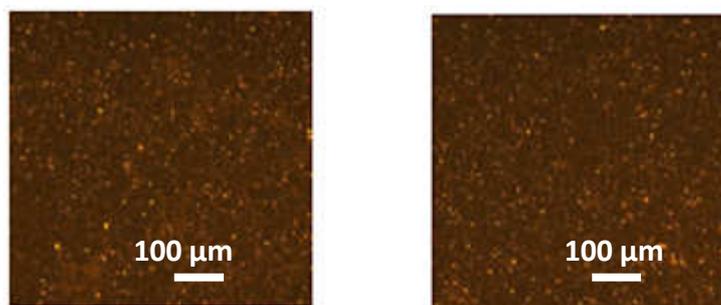


Figure IV-5. Interaction nanoparticules Nanocs® / bactéries. A) Bactéries seules sur réseau de micro-aimants ; B) Mix nanoparticules / bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 µm).

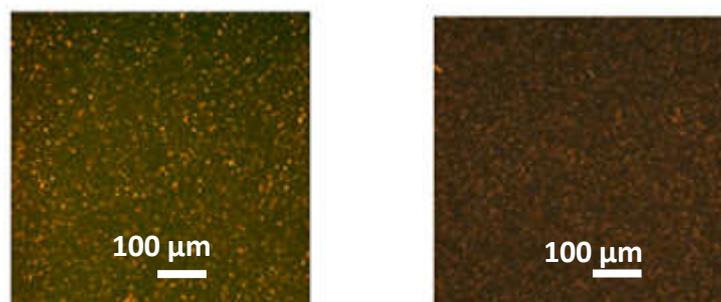


Figure IV-6. Interaction nanoparticules MiltenyiBiotech® / bactéries. a) Bactéries seules sur réseau de micro-aimants ; b) Mix nanoparticules / bactéries sur réseau de micro-aimants (100x100 µm).

II-1. Toxicité potentielle des nanoparticules

La toxicité potentielle des nanoparticules a été évaluée par un test d'inhibition de la croissance de la souche bactérienne modèle *Escherichia coli* DH5 α . Ces expérimentations ont été conduites uniquement avec les lots de nanoparticules qui ne s'adsorbaient pas sur les bactéries : les nanoparticules de diamètre 100 nm recouvertes de fonctions acide carboxylique (-COOH) commercialisées par Ademtech® et les nanoparticules de 50 nm de diamètre recouvertes de molécules de streptavidine commercialisées par Miltenyi Biotec®.

Pour les nanoparticules de 50 nm de diamètre recouvertes de molécules de streptavidine, la concentration des nanoparticules n'était pas fournie par le fabricant, ce qui nous a contraints à effectuer les tests avec des volumes croissants de suspension. Les résultats présentés sur la figure IV-7 permettent de constater que la croissance bactérienne diminue lorsque le volume de nanoparticules dans le milieu de culture augmente. Le test t-Student réalisé sur ces essais indique que l'effet toxique observé est significatif pour les échantillons les plus concentrés en nanoparticules (5 μ l et 10 μ l).

Pour les nanoparticules de 100 nm de diamètre recouvertes de fonctions acides carboxyliques, les tests de toxicité ont été effectués en fonction de la concentration de nanoparticules dans le milieu. Les résultats sont présentés sur la figure IV-8 et montrent qu'aux concentrations testées, aucun effet n'a été observé sur la croissance des bactéries.

II-2. Marquage des plasmides par des nanoparticules magnétiques

Deux stratégies de marquage ont été envisagées (cf. figure IV-9). La première consistait à marquer la totalité de la molécule de plasmide (marquage qualifié de total) et était destinée à coupler l'ensemble des molécules d'ADN à des nanoparticules magnétiques (figure IV-9a). Dans une deuxième approche, les plasmides ont été marqués de manière ciblée sur des régions limitées de l'ADN (cf. figure IV-9b).

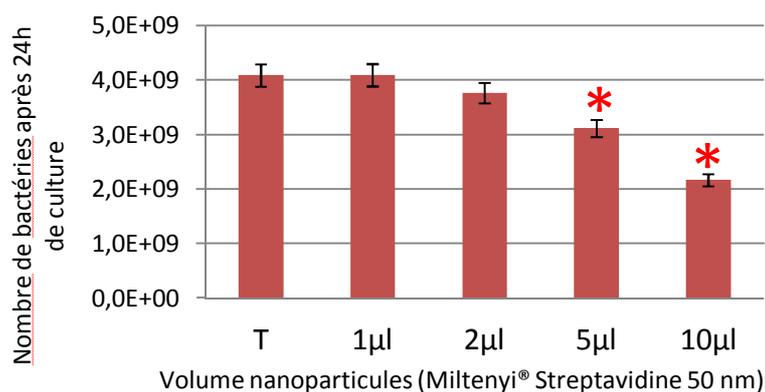


Figure IV-7. Toxicité des nanoparticules (Miltenyi Biotech® streptavidine 50nm) sur la croissance d'*E.coli* DH5α après 24h d'incubation. (* Résultats significativement différents par rapport au témoin positif)

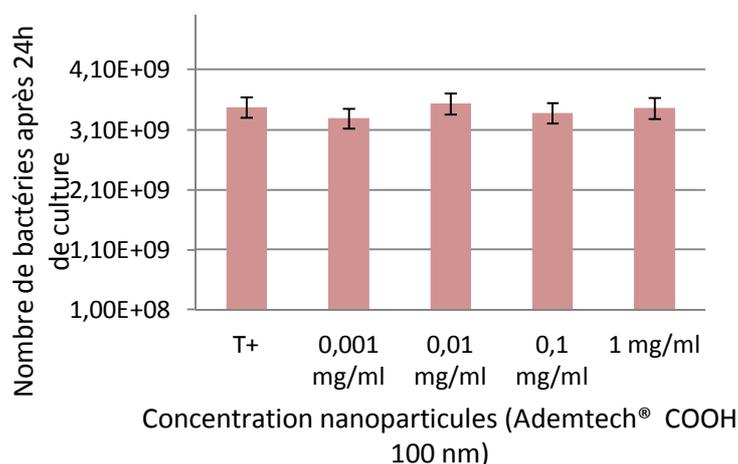


Figure IV-8. Influence de la concentration en nanoparticules (Ademtech® COOH 100 nm) sur la croissance d'*E.coli* DH5α après 24h d'incubation.

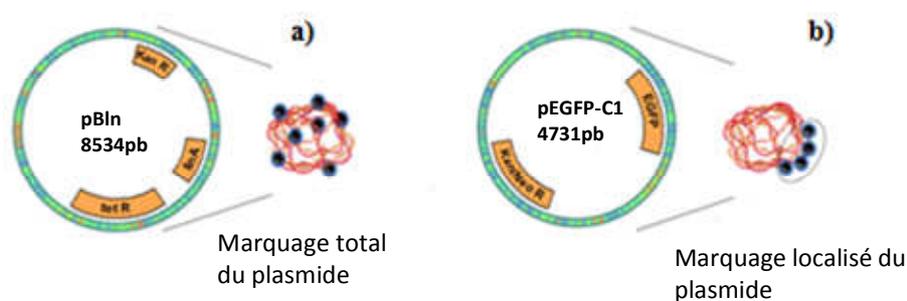


Figure IV-9. Représentation schématique des différents types de marquage de l'ADN par des nanoparticules magnétiques. a) marquage total ; b) marquage localisé.

II-2-1. Marquage total des plasmides

Le marquage total a été effectué sur le plasmide pBln de 8,5kb portant deux gènes de résistance à des antibiotiques (tétracycline et kanamycine) ainsi que le gène *linA* codant la première étape de la dégradation du pesticide lindane (gamma-hexachlorocyclohexane). Les molécules plasmidiques ont été liées aux nanoparticules en utilisant la complémentarité de liaisons chimiques permettant de coupler les deux entités. La liaison amide établie sur la réaction entre un acide carboxylique et une amine a été utilisée pour une première tentative. La seconde consistait à lier les plasmides à des nanoparticules par liaison biotine-streptavidine.

II-2-1-1. Couplage plasmides - nanoparticules par liaison amide

Pour réaliser un couplage par l'intermédiaire d'une liaison amide, les nanoparticules de 100 nm de diamètre recouvertes de fonctions acides carboxyliques (Ademtech®) ont été utilisées. En réagissant avec des fonctions amines, celles-ci pouvaient alors former une liaison amide covalente. Cependant, l'ADN ne possédant pas de fonctions amine à sa surface, une étape de fonctionnalisation s'est avérée nécessaire et a donc été réalisée à l'aide d'un kit de marquage de l'ADN, le kit MIRUS Label IT® amine Nucleic Acid Labeling Kits. Une fonctionnalisation de la totalité de la molécule d'ADN a été réalisée en incorporant une fonction amine toutes les 50 paires de base, dans le but de faire réagir les nanoparticules avec l'ADN fonctionnalisé (cf. figure IV-10).

II-2-1-2. Caractérisation du marquage par liaison amide

L'effectivité du marquage a été confirmée par comparaison de la mobilité électrophorétique des différents types d'ADN (nu, après marquage NH₂, après couplage nanoparticules) sur gel d'agarose. Cette migration étant dépendante des charges et/ou de la taille des ADN, une modification de celles-ci (fonctionnalisation amine ou couplage) doit conduire à une migration différentielle des différentes entités. Les résultats du gel d'électrophorèse (figure IV-11) confirment l'absence de liaison non spécifique entre le plasmide seul et les nanoparticules : la migration du témoin plasmide seul + nanoparticules (piste 2) présente la même mobilité que l'ADN plasmidique (piste 1). On peut également constater une légère rétention de migration pour les pistes 1 et 2 par rapport aux pistes 3 et 4, ce qui pourrait confirmer l'état de la fonctionnalisation de l'ADN par les amines. Les amines étant chargées positivement en solution, celles-ci modifient la charge globale de l'ADN. Il n'y a cependant pas de différence de mobilité assez significative entre les pistes 1 et 2 pour conclure à un couplage effectif entre l'ADN fonctionnalisé et les nanoparticules, le marquage ne fonctionnant pas dans ces conditions expérimentales.

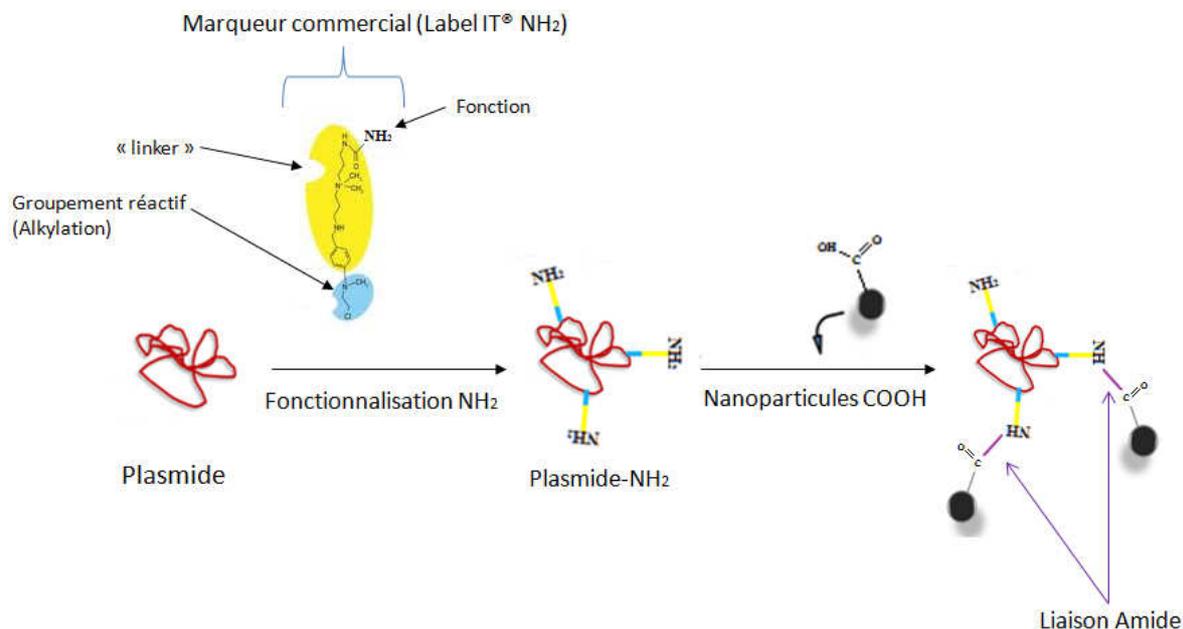


Figure IV-10. Représentation schématique de la fonctionnalisation amine de l'ADN et du couplage par liaison amide avec des nanoparticules possédant des groupements acide carboxylique (-COOH).

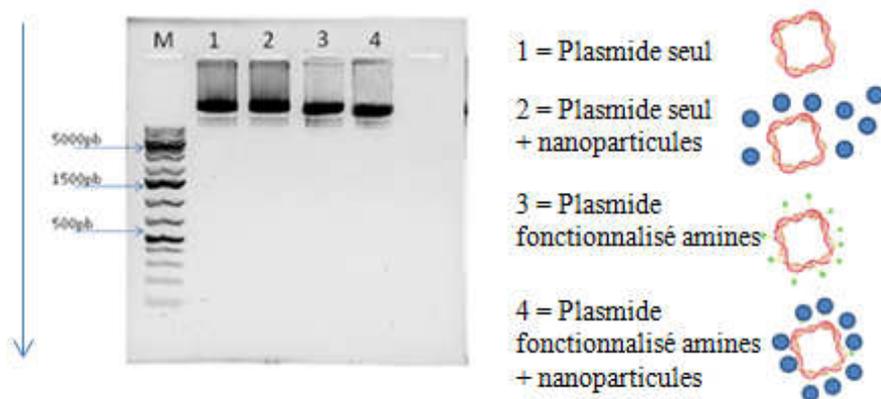


Figure IV-11. Caractérisation du marquage de l'ADN (plasmide-NH₂/nanoparticules COOH) par migration sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration.

II-2-1-3. Couplage plasmides-nanoparticules par liaison biotine-streptavidine

En utilisant les nanoparticules de 50 nm recouvertes de molécules de streptavidine (MiltenyiBiotec®), une fonctionnalisation préalable des molécules de plasmides par des biotines a été nécessaire (MIRUS Label IT®). Selon le même principe que pour les amines, la fonctionnalisation de ce kit a permis de fonctionnaliser l'ADN par l'ajout d'une biotine toutes les 50 pb de l'ADN. Le couplage ADN/nanoparticules avec les nanoparticules streptavidine a ensuite pu être réalisé en ajoutant des nanoparticules streptavidine dans la solution de plasmides-biotine (cf. figure IV-12).

II-2-1-4. Caractérisation du marquage par liaison biotine-streptavidine

Comme pour le marquage précédent, la caractérisation du couplage plasmide-nanoparticules a été effectuée par comparaison des mobilités électrophorétiques des différents types d'ADN (nu, après marquage biotine, après couplage nanoparticules). Les résultats (figure IV-13) montrent clairement des différences de mobilité électrophorétique de chacune des entités. On constate pour l'ADN fonctionnalisé par des biotines (piste 3) une légère rétention de migration par rapport à l'ADN non fonctionnalisé, un résultat qui confirmerait la fonctionnalisation par les biotines, l'ajout de molécules à la surface des ADN modifiant leur mobilité électrophorétique. La rétention de migration des échantillons marqués par des nanoparticules (piste 4) traduit l'encombrement stérique imposé par les nanoparticules situées autour du plasmide. Les nanoparticules empêchent l'ADN de migrer. Comme escompté, la migration du témoin ADN non fonctionnalisé/nanoparticule (piste 2) migre de la même façon que l'ADN seul (piste 1). Il n'y a donc pas d'interaction non spécifique entre le plasmide non fonctionnalisé et les nanoparticules.

Ce résultat indiquant la réussite du marquage a été confirmé par les images en microscopie à force atomique des ADN marqués et non marqués (figure 14). Sur ces images, les hauteurs observées pour les deux brins d'ADN (marqué et non marqué) sont comprises entre 0,1 et 0,5 nm et leur largeur est d'environ de 2 nm. Ces valeurs sont comparables aux valeurs rapportées pour la double hélice d'ADN. Les « sphères » regroupées autour de l'ADN (figure 7b) ont un diamètre de 50 nm, ce qui coïncide avec le diamètre des nanoparticules. Ces « sphères » ne sont pas observées sur l'ADN seul, ce qui tend à démontrer que des nanoparticules sont attachées à l'ADN et à confirmer l'effectivité du marquage.

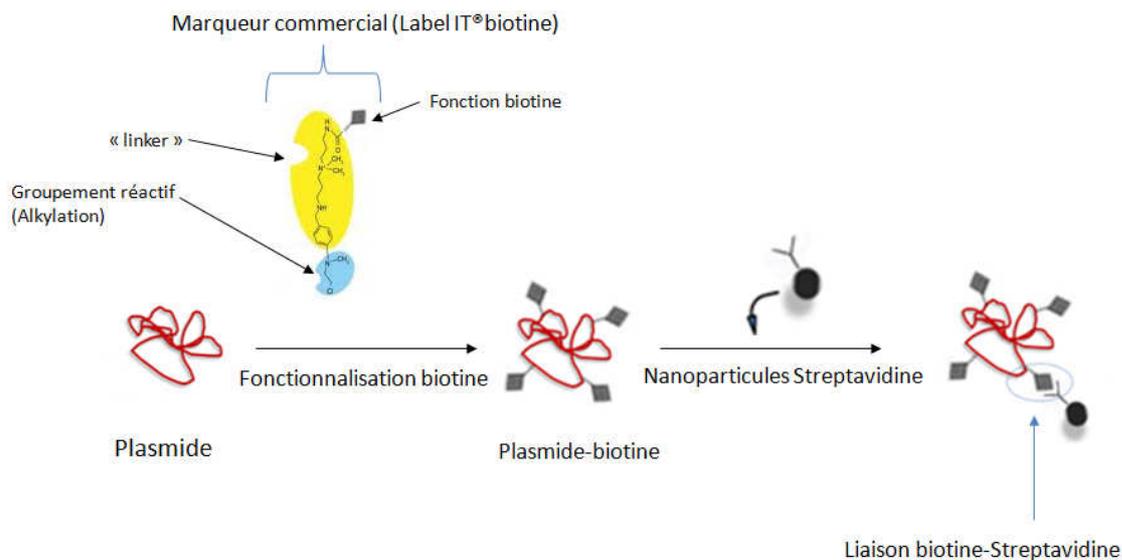


Figure IV-12. Représentation schématique de la fonctionnalisation biotine de l'ADN et du couplage par liaison biotine-streptavidine avec des nanoparticules recouvertes de streptavidine.

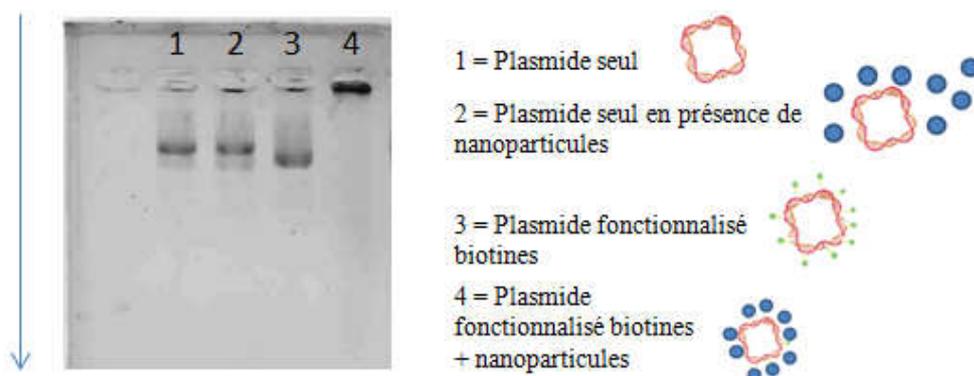


Figure IV-13. Caractérisation du marquage ADN-biotine/nanoparticule-streptavidine sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration.

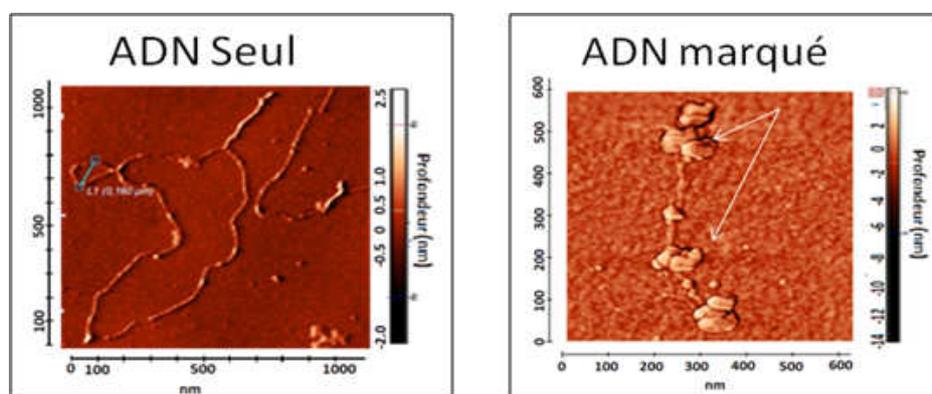


Figure IV-14. Caractérisation du marquage ADN-biotine/nanoparticule-streptavidine par microscopie à force atomique. En a) plasmide seul, b) plasmide marqué.

II-2-2. Marquage localisé de l'ADN

Le marquage localisé a été réalisé sur le plasmide pEGFP-C1. La construction de ce marquage consistait en la ligation dans les plasmides d'un fragment d'ADN linéaire de 691pb (appelé *lacZ* ou, lorsque ce fragment a été fonctionnalisé par des biotines, *lacZ*biotine) obtenu par amplification PCR à partir du gène *lacZ*. Au cours de sa synthèse, deux sites de restriction enzymatique ont été ajoutés à ses extrémités de façon à favoriser son clonage dans le plasmide. Un schéma illustrant le principe de ce marquage est représenté figure IV-15 et les résultats de ce clonage sont décrits ci-dessous.

II-2-2-1. Ligation du fragment *LacZ* dans le plasmide pEGFP-C1

Les résultats de l'intégration localisée du fragment sont présentés dans la figure IV-16. Cette figure présente les profils de migration des différents échantillons réalisés au cours de l'expérience. Sur cette figure, les pistes 1 et 2 présentent respectivement les profils de migration des produits de ligation *lacZ*biotine-plasmide et *lacZ*-plasmide. Les profils obtenus sur ces échantillons présentent 7 bandes distinctes que l'on peut analyser en se référant à la migration chez les témoins. La bande de 4.7 kb correspond au plasmide digéré (piste 3). Les trois bandes inférieures sont des concatémères de fragments *lacZ* (piste 4) ou *lacZ*biotine (piste 5) issus du processus de ligation (ligation des produits *lacZ* entre eux). On constate que la migration du fragment *lacZ*biotine est retardée. La piste 6 présente la migration du fragment *lacZ* à une distance lui conférant une taille équivalente à 691pb, la piste 7 le plasmide digéré.

Les produits de ligation d'intérêt, c'est-à-dire les plasmides fonctionnalisés par ligation avec des fragments *lacZ* biotinylés, correspondent aux bandes à 5,3kb (691pb -fragment- + 4,7kb -plasmide-) sur la piste 1 (encadré en rouge). Les fragments *lacZ*-plasmide correspondant aux bandes de 5,3kb sur la piste 2 (encadré en bleu) ont été également récupérés pour effectuer des témoins de marquage avec les nanoparticules.

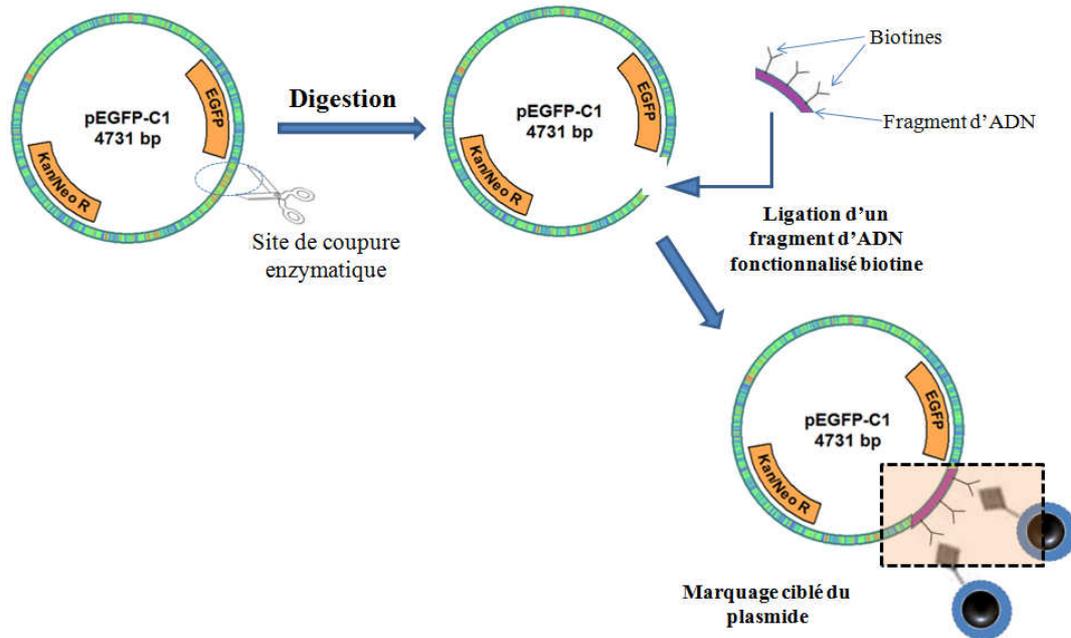


Figure IV- 15. Schéma général de la procédure de marquage ciblé.

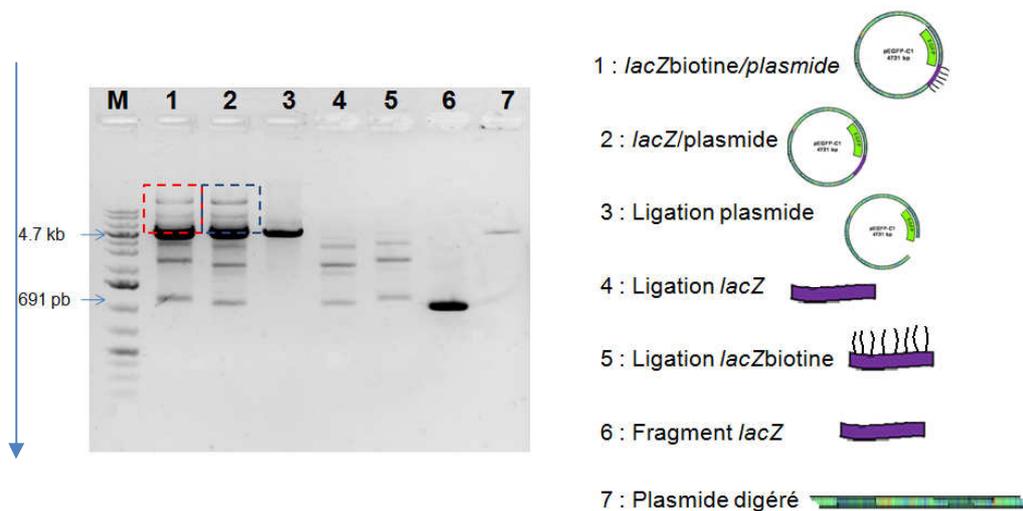


Figure IV- 16. Caractérisation de la ligation du fragment d'ADN biotinylé dans le plasmide pEGFP-C1 par migration sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration.

II-2-2-2. Marquage de la ligation *lacZ*biotine-pEGFP-C1

Après avoir extrait du gel les produits d'intérêt, les nanoparticules streptavidine (Miltenyi Biotec® ø50nm) ont été mises en présence des différentes constructions. Les profils électrophorétiques de migration présentés sur la figure IV-17 illustrent les expériences de marquage réalisées avec les produits de ligation précédemment extraits.

Les pistes 1 et 3 appartiennent aux expériences témoins réalisées à partir des produits de ligation *lacZ*-plasmide. La piste 1 montre le produit de ligation *lacZ*-plasmide seul, la piste 3 le produit de ligation *lacZ*-plasmide en présence de nanoparticules. Les profils sont identiques pour chacun de ces échantillons. Ces résultats confirment donc qu'il n'y a pas d'interactions non spécifiques entre plasmides et nanoparticules. Néanmoins, une bande à 4,7 kb et une bande à 5,3 kb ont été observées. La bande de 4,7 kb correspond au plasmide digéré qui a été co-extrait du gel précédent. La bande à 5,3 kb correspond à la ligation plasmide-*lacZ* (691pb + 4,3 kb), la construction d'intérêt.

Les pistes 2 et 4 correspondent aux résultats obtenus avec les produits de ligation *lacZ*biotine-plasmide avant et après marquage. En piste 2, deux bandes distinctes à 4.7 kb et à 5.3 kb sont observables. Au niveau de la piste 4, la même bande à 4,7 kb est détectée. A la différence des autres échantillons, la bande de 5.3 kb n'est pas détectable mais une bande est visible au niveau du puits (entouré en bleu), ce qui confirmerait l'établissement du marquage localisé. La rétention de migration des échantillons marqués (piste 4) serait témoin de l'encombrement stérique imposé par les nanoparticules situées autour du plasmide, qui l'empêcherait de migrer.

Le marquage localisé qui permettait de réduire la zone de marquage sur une partie du plasmide a été réalisé avec succès. Les résultats obtenus à partir des gels (figure 17) confirment la réussite de cette étape. Cependant, les rendements de cette technique sont extrêmement faibles. L'étape d'extraction avant marquage s'accompagne d'une perte significative d'ADN nécessitant de grosses quantités de matériel (figure IV-17, piste 4) ne permettant pas d'envisager cette approche pour la suite des expérimentations.

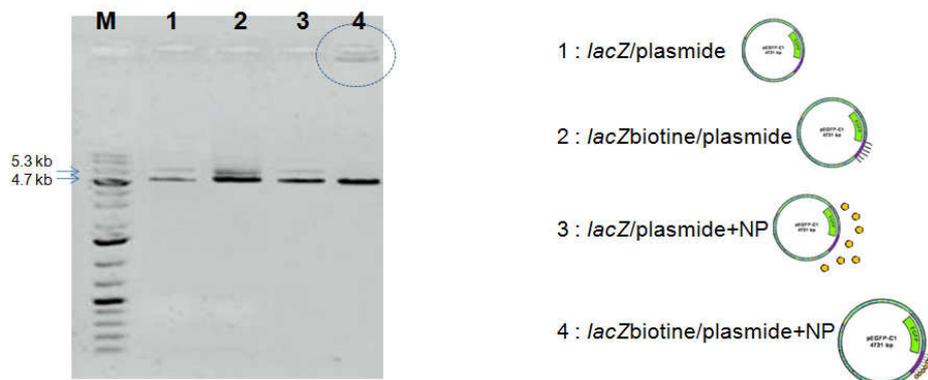


Figure IV- 17. Caractérisation du marquage ciblé du plasmide pEGFP-C1 par migration sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration

II-3. Purification des conjugués plasmides-nanoparticules

Pour des raisons de protocole, l'opération de greffage a nécessité de mettre en excès les nanoparticules dans le mélange réactionnel. Par conséquent, il restait systématiquement des nanoparticules libres en solution après réaction. Pour éviter qu'elles ne corrompent les expérimentations par diffusion dans les bactéries lors des processus de transformation, une méthode de purification a dû être développée pour éliminer les nanoparticules en excès. Quatre approches ont été envisagées. Les résultats obtenus avec chacune d'entre elles sont décrits ci-dessous.

II-3-1. Centrifugation sur filtre

Les filtres à centrifuger devaient permettre le passage des nanoparticules à travers une membrane poreuse tout en conservant l'ADN marqué (figure IV-18). Le choix de la taille des pores du filtre (de 100 nm de diamètre (correspondant à une taille d'exclusion de 10⁶DA)) s'est d'abord basé sur la taille des nanoparticules (diamètre de 50nm) tout en sachant que la taille des pores des filtres devait être légèrement supérieure à la taille réelle des nanoparticules, selon les recommandations du fabricant (Vivacon®). Pour confirmer que la taille des ADN marqués permettait leur rétention par le filtre, des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées sur les échantillons de marquage. Les résultats (figure IV-19) présentent clairement deux distributions de taille qui correspondraient aux deux entités présentes dans le mélange : les nanoparticules et les plasmides marqués. La première distribution de taille, centrée autour de 69 nm, correspondrait aux nanoparticules. On constate que celles-ci sont légèrement plus grosses que ce qui était annoncé par le fabricant. Toutefois, il est généralement admis que le diamètre hydrodynamique (que mesure la DLS) est généralement supérieur à la taille déterminée par microscopie électronique. La seconde distribution, centrée autour de 231 nm, correspondrait au diamètre des plasmides marqués.

Ces résultats confortent le choix des filtres (100nm) pour effectuer la séparation, l'ADN marqué devant être retenu et les nanoparticules devant traverser le filtre. Cependant, les nanoparticules sont restées fixées sur les filtres, du fait d'une possible interaction chimique avec la membrane du filtre, ce qui nous a conduits à abandonner cette méthode de purification.

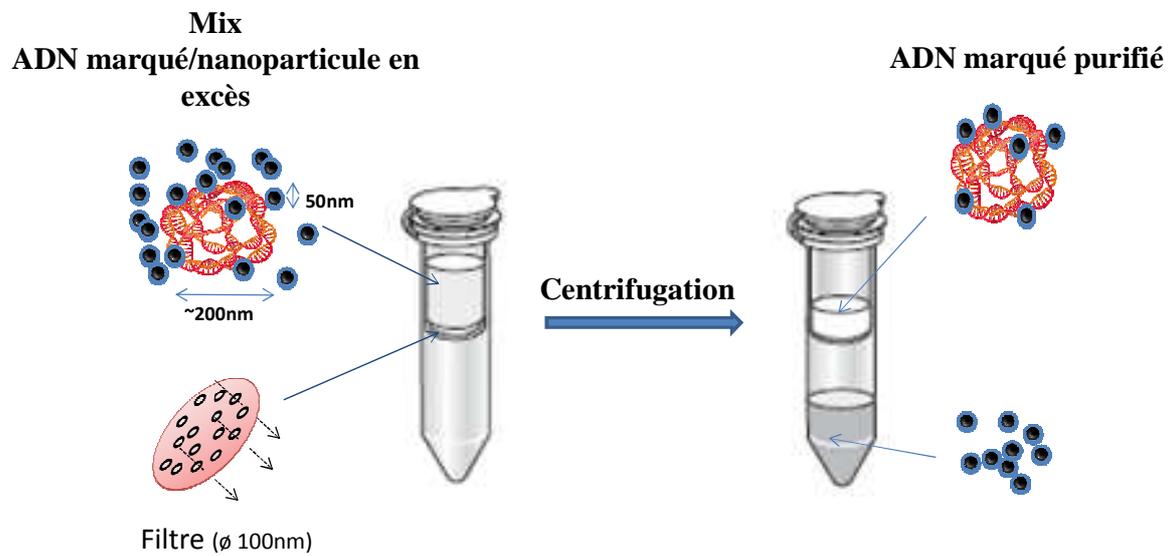


Figure IV-18. Représentation schématique du principe de filtration par filtre à centrifugation

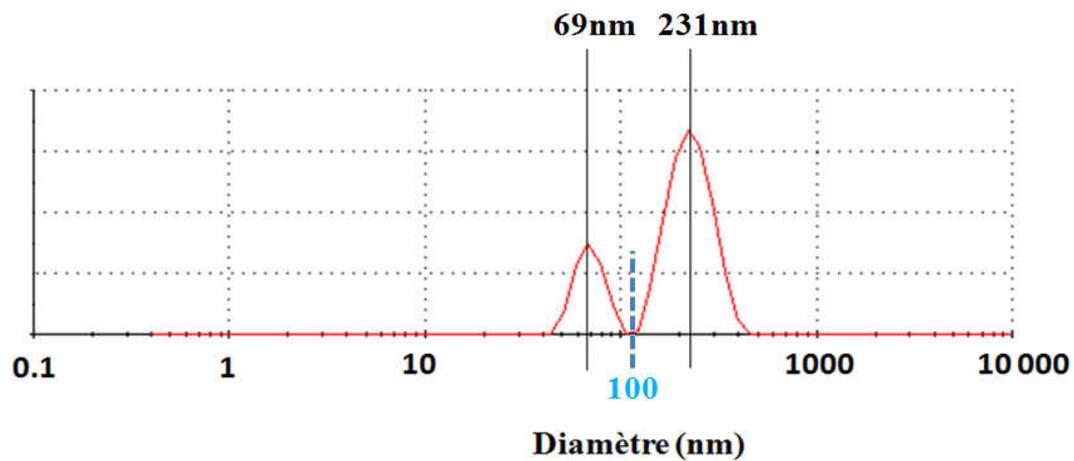


Figure IV-19. Profil de diffusion dynamique de la lumière d'un mix plasmide marqué/nanoparticules.

II-3-2. *Chromatographie d'exclusion*

La chromatographie d'exclusion permet également de séparer les molécules en fonction de leur taille mais en les faisant circuler dans une colonne de gel de billes poreuses de sépharose (les petites molécules diffusant d'avantage que les grosses demeurent dans la colonne un temps supérieur) (figure IV-20). Avec cette technique, la notion de petites et de grosses molécules est dépendante de la gamme de fractionnement du gel déterminé par la taille de ses pores. Ce domaine de fractionnement a été choisi de manière à couvrir une gamme la plus large possible. Pour vérifier l'efficacité de cette méthode, des mesures de profils de DLS en sortie de la colonne ont été réalisées, dans le but de confirmer la taille des entités en fonction de ce qui était attendu (la distribution de taille correspondant uniquement aux plasmides marqués).

La difficulté de l'approche tient dans la difficulté à maîtriser la pression exercée sur la colonne afin que l'échantillon y circule correctement pour assurer une résolution adéquate de la séparation. A défaut de posséder un système de contrôle de flux pour chromatographie, les alternatives envisagées (centrifugation de la colonne) ne se sont pas révélées satisfaisantes.

II-3-3. *Extraction sur gel d'agarose*

La troisième méthode a été quant à elle basée à la fois sur la différence de taille mais aussi sur la différence de charge des molécules. Il s'agissait d'extraire du mélange l'élément génétique magnétiquement marqué après la migration électrophorétique du mélange sur un gel d'agarose (figure IV-21). Cependant, les rendements d'extraction, beaucoup trop faibles, ont été préjudiciables à l'utilisation future de cette technique.

II-3-4. *Purification sur colonne de silice*

Dans une quatrième approche, nous avons utilisé l'affinité de l'ADN pour la silice. Dans ce contexte, comme nous l'avons énoncé dans la section « Matériels et Méthodes », l'ADN marqué, fixé sur une membrane de silice, est lavé des nanoparticules libres puis désorbé pour être repris en solution (figure IV-22).

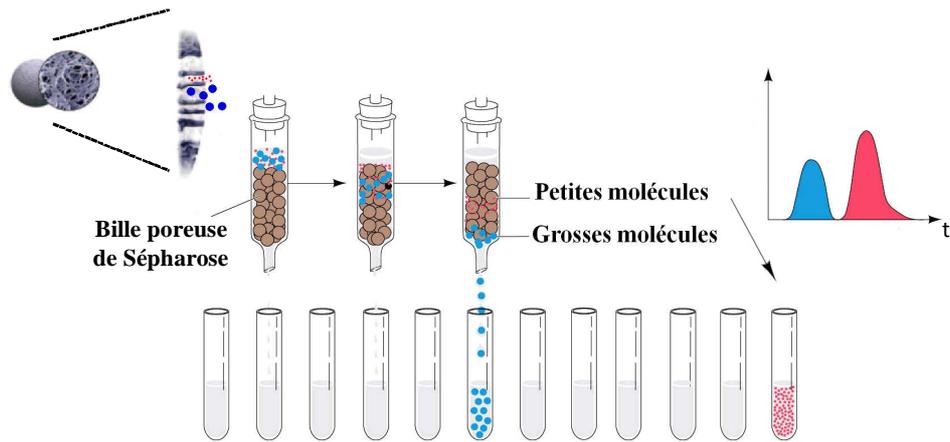


Figure IV-20. Illustration schématique du principe de chromatographie d'exclusion.

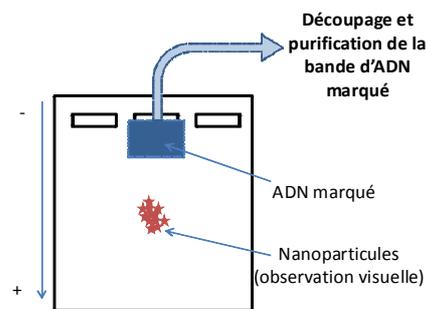


Figure IV-21. Illustration schématique du principe d'extraction d'ADN sur gel d'agarose. La flèche en bleu indique le sens de migration

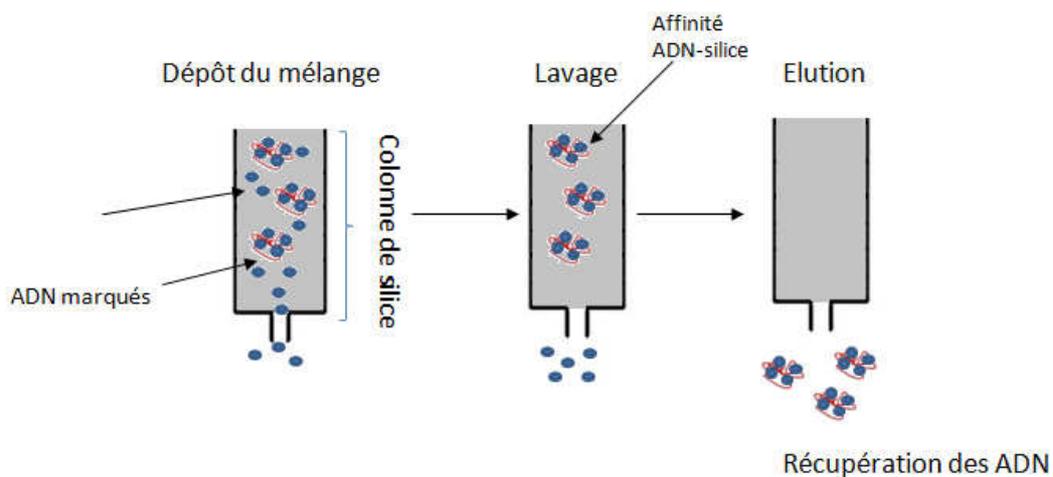


Figure IV-22. Illustration schématique du principe de purification de l'ADN marqué sur colonne de silice.

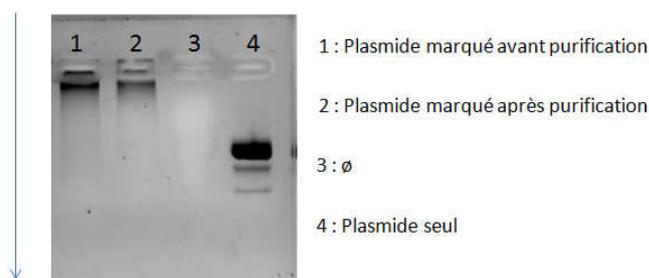
Après purification sur colonne de silice, une électrophorèse sur gel d'agarose montre une bande d'ADN correspondant au plasmide marqué (figure IV-23, piste 2), témoignant de la récupération du conjugué plasmides-nanoparticules. Pour vérifier l'efficacité de cette purification sur colonne de silice, des mesures de susceptibilité magnétique à partir de témoins réalisés en mélangeant un ADN non biotinylé et des nanoparticules ont été effectuées. Le greffage dans ces conditions étant impossible, nous avons considéré que la purification était efficace si, après traitement de ce témoin sur colonne de silice, la mesure de susceptibilité magnétique se révélait égale à celle du blanc, l'ADN seul. Ces résultats sont présentés dans le tableau 1. Les mesures obtenues montrent que la purification est efficace.

II-4. *Etude de l'accessibilité enzymatique des conjugués plasmides-nanoparticules*

L'accessibilité enzymatique des conjugués marqués de manière totale a été évaluée par amplification PCR d'un gène présent sur le plasmide, le gène *linA*. L'ADN seul, l'ADN seul en présence de nanoparticules, l'ADN fonctionnalisé par des biotines ont été traités de la même façon que l'ADN marqué. Les résultats (figure IV-24) montrent que le produit PCR attendu (320pb) était détecté au niveau des amplifications effectuées à partir de l'ADN seul (piste 1) et de l'ADN seul en présence de nanoparticules (piste 2). Par contre, le plasmide fonctionnalisé (piste 3) et le plasmide marqué (piste 4) ne génèrent pas ce fragment ce qui peut être interprété par le fait que la fonctionnalisation empêcherait l'accessibilité de la polymérase au plasmide et par conséquent l'amplification du gène.

II-5. *Internalisation de l'ADN marqué dans des bactéries*

Les bactéries ont été électroporées en présence du plasmide marqué magnétiquement. Les résultats (figure IV-25) montrent que dans les conditions avec les témoins bactéries seules (figure IV-25a), bactéries seules préparées pour l'électroporation, (figure IV-25b) et bactéries témoins électroporation (figure IV-25c), les cellules bactériennes ne sont pas attirées sur le réseau de micro-aimants puisqu'aucun motif représentatif du champ d'attraction des aimants n'est détectable. En revanche, sur la figure IV-25d qui montre les résultats obtenus à la suite de l'électroporation des bactéries en présence du plasmide magnétique, des motifs carrés apparaissent, ce qui laisse supposer que des plasmides marqués ont effectivement été internalisés dans les bactéries et qu'il est possible d'isoler des bactéries ayant acquis un ADN marqué magnétiquement par transfert.



	Avant	Après
H ₂ O	-0,72 x 10 ⁻⁶	
ADN	-0,72 x 10 ⁻⁶	
ADN seul + Nanoparticules	+1,220 x 10 ⁻⁶	-0,72x 10 ⁻⁶

Figure IV-23. Récupération du plasmide marqué après purification sur colonne de silice.

Tableau 1. Susceptibilité magnétique obtenue sur les témoins du marquage et l'échantillon marqué avant et après purification (unité cgs).

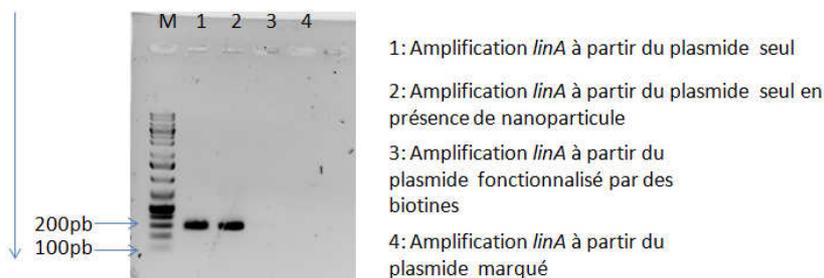


Figure IV-24. Gel d'électrophorèses faisant référence aux expériences d'accessibilité enzymatique du plasmide

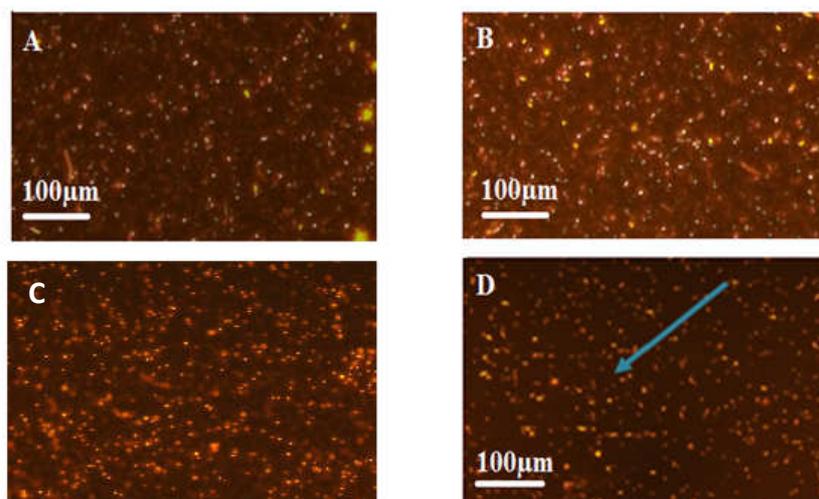


Figure IV-25. Attraction de bactéries transformées par électroporation par un plasmide magnétique sur réseau de microaimants. A) Bactéries seules ; B) bactéries seules préparées pour l'électroporation ; C) bactéries témoins électroporation (présence du plasmide mais pas de choc électrique donc pas d'internalisation) ; D) bactéries ayant internalisé des plasmides magnétiques par électroporation. Le réseau de micro-aimants possède des motifs magnétiques carrés de 100x100 µm. La fluorescence orange des bactéries est liée à l'intercalation du BET au niveau de l'ADN.

III) DISCUSSION

Les génomes des procaryotes et plus particulièrement ceux des bactéries, tels qu'ils peuvent être aujourd'hui décryptés grâce aux nouvelles technologies de séquençage et à l'apport de la bioinformatique apparaissent comme de véritables mosaïques génomiques, signe d'un brassage continu et de grande ampleur lié aux transferts horizontaux de gènes²⁴³. Les transferts horizontaux de gènes ont donc largement participé à l'évolution des génomes bactériens faisant partie de l'impressionnant arsenal bactérien d'adaptation à de nouvelles conditions environnementales²⁴⁴. En témoigne l'inquiétante dispersion des gènes de résistance à des antibiotiques suite à la découverte et l'utilisation souvent irraisonnée de ces molécules^{245,227}. Mais les conséquences ne sont pas toujours aussi défavorables, comme le montre la capacité nouvellement acquise des bactéries à dégrader des polluants xénobiotiques²²⁶. C'est en effet par le transfert et la recombinaison de fragments d'ADN provenant de différents microorganismes que certaines souches de bactéries ont réussi à développer de nouvelles compétences cataboliques. En leur permettant de dégrader des composés jusque là récalcitrants comme les chlorés par exemple le transfert de gènes leur a permis l'accès à de nouvelles ressources nutritives, contribuant ainsi à l'accroissement de leur valeur adaptative (fitness)²⁴⁶.

Paradoxalement, le transfert horizontal de gènes qui a fait l'objet sur quelques souches bactériennes modèles de très nombreux travaux pour décrypter les mécanismes moléculaires les plus fondamentaux de la transformation, de la conjugaison ou de la transduction demeure insuffisamment étudié dans l'environnement du fait de difficultés spécifiques. La raison en est d'abord le très faible pourcentage de bactéries cultivables car estimer la possible dispersion d'un gène dans une communauté quand seulement moins de 1 % de ces bactéries peuvent être cultivées *in vitro* est nécessairement non satisfaisant. L'approche métagénomique n'est pas plus convaincante du fait de l'extrême diversité bactérienne⁵⁸. Celle-ci contribue déjà à rendre irréaliste la reconstruction de génomes totaux à partir de séquences métagénomiques, étape qui pourtant serait susceptible de permettre de détecter dans ces génomes de bactéries majoritairement non cultivées la présence d'un gène nouvellement acquis²³⁶. De toutes façons, le nombre d'analyses à effectuer pour cribler la totalité des génomes bactériens d'une communauté bactérienne tellurique, y compris ceux des espèces avec le plus faible nombre de représentants (biosphère rare), à la recherche de ces nouveaux gènes serait si important qu'une telle approche demeurera longtemps encore totalement du domaine de l'utopie.

Pourtant de nombreuses questions sont encore à solutionner comme celles ayant trait aux microorganismes (tant donneurs que receveurs) concernés dans chaque environnement par chaque mécanisme de transfert, les fréquences associées, leur régulation par les différents paramètres environnementaux en liaison avec ceux liés à la génétique et à la physiologie

bactérienne, leur impact sur le potentiel fonctionnel de l'organisme et sa valeur adaptative et au niveau supérieur, sur la structure taxonomique des communautés et le fonctionnement des écosystèmes.

Le travail présenté ici s'inscrit donc dans la recherche de méthodologies alternatives pour aborder certaines de ces questions concernant notamment spectre et fréquence d'acquisition de gènes chez des bactéries indigènes au-delà des seules cultivables. Des performances de sensibilité et de spécificité sont requises pour détecter dans une suspension bactérienne complexe la très faible proportion de cellules ayant subi un événement de transfert du fait de la fréquence de réalisation *in situ* très faible³⁶ car dans une fourchette comprise entre 10^{-3} et $<10^{-10}$. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à appliquer la technologie de manipulation des cellules magnétiques développée dans les chapitres précédents à une suspension bactérienne extraite d'un sol préalablement inoculé avec un ADN donneur (extracellulaire (nu) ou intégré dans une souche bactérienne donatrice) marqué par des nanoparticules magnétiques. Dans une phase de conception méthodologique, il s'agissait dans un premier temps de développer la base de cette nouvelle méthodologie qui consistait à greffer sur des molécules d'ADN cible des nanoparticules magnétiques permettant de manipuler, grâce à des micro-aimants, les cellules bactériennes marquées par cet ADN. Celle-ci a été abordée selon trois étapes : i) le marquage *in vitro* de l'ADN par des nanoparticules magnétiques, ii) l'internalisation de l'ADN marqué dans des bactéries et iii) l'attraction des bactéries marquées sur un réseau de micro-aimants.

III-1. Marquage *in vitro* d'ADN par des nanoparticules magnétiques

III-1-1. Choix des nanoparticules magnétiques

Le choix des nanoparticules s'est en premier lieu basé sur un critère de taille. En effet, celles-ci devaient être suffisamment petites pour pouvoir pénétrer aisément à l'intérieur des bactéries dont la taille, en conditions environnementales est généralement inférieure à $1\mu\text{m}$. Leur greffage sur l'ADN nécessitait la fonctionnalisation chimique de celui-ci au travers de liaisons amide ou biotine-streptavidine nécessitant de sélectionner les nanoparticules en conséquence, c'est-à-dire fonctionnalisées par des groupements acide carboxylique (-COOH) ou par des molécules de streptavidine. Quatre fournisseurs proposaient des types de nanoparticules magnétiques se différenciant par leur taille et leur fonctionnalisation chimique.

- Océan NanoTech® pour des nanoparticules magnétiques de 20 nm de diamètre recouvertes de fonctions acides carboxylique (-COOH)
- Ademtech® pour des nanoparticules magnétiques de 100 nm de diamètres recouvertes de fonctions acides carboxylique (-COOH)
- Nanocs® pour des nanoparticules magnétiques de 30 nm de diamètre recouvertes de molécules de streptavidine

- MiltenyiBiotec® pour des nanoparticules magnétiques de 50 nm de diamètre recouvertes de molécules de streptavidine

Les premières expérimentations ont cependant rapidement conduit à éliminer deux types de nanoparticules qui présentaient la particularité de s'adsorber de façon non spécifique à la surface des bactéries. Des tests d'inhibition de la croissance bactérienne ont également montré que ces différents matériaux ne présentaient pas les mêmes caractéristiques de toxicité, celle-ci dépendant en outre de nombreux facteurs, la concentration, la durée d'exposition, la composition de l'environnement dans lequel a lieu l'exposition et la cible biologique²⁴⁷. Il ne peut donc être exclu que les résultats observés ici avec la souche bactérienne *E. coli* ne soient directement transposables à tous les germes bactériens. C'est notamment vrai pour le lot de nanoparticules MiltenyiBiotec® pour lesquelles une perturbation de la croissance bactérienne était notée pour une concentration équivalente à celle requise pour le marquage de l'ADN. Cependant, les procédures de purification développées après marquage afin d'éliminer les nanoparticules résiduelles entraînaient une baisse de la concentration en dessous d'un seuil de toxicité. Ce seuil de toxicité n'a pas été atteint avec le dernier lot de nanoparticules (Ademtech®) confirmant l'importance du choix des nanoparticules à utiliser dans les travaux qui viseraient des communautés complexes et potentiellement la nécessité d'expérimentations préliminaires pour évaluer la toxicité de ces différents objets sur les cibles visées. La première cible serait déjà la bactérie donatrice dans laquelle un plasmide marqué serait introduit avant son inoculation dans un microcosme de sol par exemple en vue de réaliser des événements de conjugaison avec des représentants de la microflore indigène.

III-1-2. *Choix de l'ADN*

Le choix s'est porté sur un plasmide, molécule d'ADN extra chromosomique se répliquant et assurant de façon autonome son transfert chez des bactéries réceptrices et porteur de gènes qualifiés de sélectifs en ce sens qu'ils permettent la croissance de la bactérie sur un milieu de culture additionné de l'agent de sélection (ici des antibiotiques). L'intérêt potentiel d'un plasmide dans le cadre de cette étude est sa possibilité d'être transmis par conjugaison²⁴⁸ mais aussi par transformation si l'ADN vient à se trouver à l'état extracellulaire au voisinage de la cellule, elle-même dans un stade de compétence²⁴⁹. Par conjugaison ou transformation, la molécule plasmidique peut-être internalisée et garder son potentiel auto-répliatif ou bien être intégrée au génome de l'hôte par recombinaison homologue, homéologue ou illégitime²²³. Toutefois, aucun des travaux réalisés ici ne permet d'affirmer que les propriétés répliatives du plasmide marqué par les nanoparticules soient conservées ou que les gènes puissent être transcrits. Seule une expérimentation visant à vérifier l'accessibilité enzymatique de l'ADN a été conduite en utilisant l'ADN polymérase pour tenter de réaliser l'amplification d'un ADN matrice marqué. Cette expérimentation montre l'impossibilité de l'amplification due aux fonctions biotines sans que les nanoparticules puissent être mises en cause. La possibilité d'un événement de recombinaison impliquant une molécule marquée

par ces nanoparticules n'a pas non plus été étudiée. Enfin, les processus conduisant à la réalisation d'un transfert conjugatif entre cellule donatrice et réceptrice ou ceux de l'intégration d'une molécule d'ADN linéaire ou surenroulée par transformation naturelle devront être validés expérimentalement, ce qui pourrait aussi conduire à la sélection de nanoparticules compatibles avec ces processus biologiques. Seule la pénétration passive des molécules d'ADN dans une cellule après perméabilisation chimique ou physique (électrique) des enveloppes ne devrait pas être affectée par le marquage par des nanoparticules hormis la taille de ces dernières, l'encombrement supplémentaire généré pouvant affecter le passage physique de la molécule d'ADN.

III-1-3. Marquage de l'ADN

III-1-3-1. Stratégies de marquage du plasmide.

Le plasmide pBln utilisé porte deux gènes de résistances à des antibiotiques, la kanamycine (KanR) et la tetracycline (TetR), permettant aux bactéries le contenant de croître sur des milieux additionnés de ces antibiotiques, et un gène très rare dans les bactéries du sol *linA* dont l'expression sur un milieu de culture solide contenant du lindane génère un halo de dégradation aisément repérable autour de la colonie. Des plasmides conjugatifs à large spectre d'hôtes trouveront toute leur utilité dans les expérimentations futures quand auront été confirmées ou définies les conditions (y compris le choix des nanoparticules) qui permettront le transfert, la réplication, l'expression des gènes de ces molécules marquées par les nanoparticules. Dans une telle option, un marquage sur l'ensemble de la molécule a été réalisé (défini comme marquage total) tandis qu'une alternative (définie comme marquage localisé) a été initiée dans laquelle seule une partie du plasmide a été fonctionnalisée et marquée tandis que les régions contenant les gènes de la réplication et de sélection ont été laissées libres de tout marquage, afin de limiter un potentiel effet délétère des nanoparticules. Seuls sont présentés ici les travaux de préparation de ces plasmides dont le comportement dans des cellules bactériennes sera défini dans des études ultérieures.

III-1-3-2. Fonctionnalisation chimique et couplage ADN/nanoparticules

Différentes stratégies avaient été envisagées pour établir un lien entre nanoparticules et ADN plasmidique, y compris la création d'interactions électrostatiques non covalentes. Les charges négatives portées par l'ADN devaient servir à assurer la liaison avec des nanoparticules présentant sur leur surface des groupes fonctionnels leur conférant une charge positive. Cependant, la nécessité de liaisons fortes entre les deux éléments soumis à des contraintes significatives lors de l'internalisation de l'ADN marqué dans les bactéries, a justifié la réorientation vers d'autres types de liaisons plus fortes, les liaisons covalentes.

L'utilisation de la liaison amide s'établissant entre un groupement acide carboxylique (-COOH) et une fonction amine (-NH₂) ayant nécessité la fonctionnalisation de l'ADN avec des amines pour les faire réagir avec les nanoparticules possédant des fonctions acide carboxylique à leur surface n'a pas été couronnée de succès en dépit d'études d'autres équipes montrant l'établissement de telles liaisons avec des oligonucléotides²⁵⁰. L'hypothèse de l'encombrement stérique du plasmide, supérieur à celui des oligonucléotides, qui limiterait l'accès des nanoparticules aux fonctions amines de l'ADN semble être la seule acceptable selon nos connaissances. Les résultats obtenus avec la liaison biotine-streptavidine ont été satisfaisants, la biotine étant une petite molécule capable d'occuper un site moléculaire de la protéine streptavidine où elle est maintenue par un très grand nombre de liaisons hydrogène, l'association de toutes ces liaisons produisant un marquage final presque aussi résistant que celui relevant d'une liaison covalente²⁵¹. Cette réaction, très rapide se fait sans aucune nécessité d'activation chimique après fonctionnalisation de l'ADN par des biotines, par simple mise en contact de l'ADN avec des nanoparticules recouvertes de molécules de streptavidine. Ce type de marquage s'est avéré très efficace pour le marquage de l'ADN.

III-1-4. Marquage localisé

Comme indiqué plus haut le marquage localisé visait à restreindre et contrôler la zone du plasmide sur laquelle interagissaient les nanoparticules, minimisant leur nombre et escomptant une meilleure compatibilité avec la physiologie bactérienne. Pour simplifier les constructions moléculaires, le plasmide pEGFP-C1 a été préféré au plasmide pBln, l'expression du gène *gfp* qu'il porte devant aider à vérifier ultérieurement l'expression à partir de plasmides marqués par ces nanoparticules. Des difficultés liées au rendement de marquage ont retardé ce développement méthodologique. Des expériences supplémentaires seront ultérieurement abordées en utilisant la formation de triplex permettant l'attachement d'oligonucléotides fonctionnalisés autour d'une région spécifique du plasmide²⁵². Des études montrent en effet l'intérêt de ce type de liaisons pour ajouter des fonctionnalités à des plasmides^{253,254}.

III-2. Internalisation des ADN marqués dans des bactéries

Dans une optique de recherche d'une stratégie optimale, la technique de transformation par électroporation a été utilisée. Elle consistait à soumettre les bactéries à des impulsions électriques à haute tension ayant pour but de créer des pores temporaires dans les enveloppes bactériennes et laisser ainsi diffuser l'ADN. Cette méthodologie étant couramment utilisée en laboratoire pour permettre à du matériel génétique étranger de pénétrer la cellule ^{255,256,257}, elles permettaient dans le cadre de notre étude de pouvoir contrôler efficacement l'efficacité des transformations bactériennes.

III-3. *Attraction des bactéries transformées sur un réseau de micro-aimants*

La formation de motifs aimantés a pu être observée après électroporation des bactéries en présence du plasmide marqué. Les tests en cours devant confirmer la pénétration des plasmides dans les cellules et non leur adsorption à la surface des cellules. Le recours au micro-dispositif de tri pourra ainsi permettre d'isoler les bactéries capturées pour tenter d'en extraire le plasmide ou de les cultiver sur milieux sélectifs, l'approche marquage localisé permettant potentiellement de s'affranchir des problèmes liés à l'expression comme indiqué plus haut.

III-4. *Potentiel d'application de la méthode*

Nous avons indiqué précédemment que les approches basées sur la culture ou sur la métagénomique nécessitaient d'être complétées de méthodes alternatives pour rendre compte de l'implication réelle des transferts de gènes en milieu naturel. A ce titre, la stratégie développée ici se situe dans un registre conceptuellement comparable à l'approche consistant à équiper un ADN donneur d'un gène codant une fonction de fluorescence qui permet de repérer, sélectionner et récupérer spécifiquement grâce à des trieurs de cellules les cellules modifiées génétiquement quand elles expriment ce gène. L'avancée majeure d'un marquage fluorescent ou magnétique tient au fait que sera considérée une fraction des populations de la communauté bactérienne bien supérieure à celle limitée par la capacité à se développer *in vitro*. Nous avons indiqué dans les chapitres précédents les biais et limites de l'approche basée sur la fluorescence, comme par exemple la nécessité d'une expression du gène fluorescent en système hétérologue, de sa répression dans la souche donatrice, d'une purification importante de la suspension bactérienne à analyser. L'autofluorescence naturelle d'une partie des populations telluriques et des constituants du sol et le débit limité des trieurs de cellules contribuent également à restreindre sérieusement l'application de cette approche basée sur la fluorescence. L'approche basée sur les propriétés magnétiques des nanoparticules liées à l'ADN donneur se démarque de ces limitations puisque le marquage cellulaire ne requiert pas l'expression d'un gène particulier et que la technologie serait beaucoup moins affectée par des problèmes de débit ou d'un niveau limité de pureté de la suspension bactérienne. Des travaux futurs nous indiqueront si la concentration de bactéries naturellement magnétiques dans différents environnements²⁵⁸⁻²⁶⁰ est compatible avec la recherche d'événements de transfert dont la fréquence de réalisation peut être très faible.

D'autres types de limites vont cependant affecter l'approche magnétique. Nous avons évoqué une potentielle toxicité des nanoparticules et une possible interférence avec la réplication des plasmides dans les cellules bactériennes, l'expression de leurs gènes, l'intégration de l'ADN par recombinaison dans le génome ce qui nous a conduits à

développer une stratégie de marquage localisé sur seulement certaines zones de l'ADN à transférer. Une particularité majeure de cette approche, en comparaison avec celle basée sur la fluorescence exprimée par un gène transféré, tient au fait que seule la cellule de première génération après transfert (celle ayant réalisé l'événement de transfert comme réceptrice) sera effectivement marquée par les propriétés magnétiques, les nanoparticules ne se multipliant pas à chaque génération. Le nombre de cellules marquées restera donc limité dans la suspension bactérienne, ne bénéficiant pas de la multiplication clonale qui accroît la capacité de détection. Mais cette limitation présente à l'inverse l'avantage de pouvoir identifier les événements de transferts indépendants et de les quantifier sans avoir à tenir compte d'une multiplication de la cellule originellement modifiée²⁶¹. Chaque cellule bactérienne repérée et récupérée spécifiquement grâce au système microfluidique pourra ensuite être soumise à une tentative de multiplication clonale par incubation en milieu de culture, ce qui conduira au développement d'une colonie si la bactérie appartient à la faible proportion des bactéries cultivables et les autres bactéries qui appartiennent à l'immense réservoir des non cultivables seront également concernées grâce aux techniques de séquençage et de métagénomique classique. Dès lors, cette manière d'appréhender le transfert de gènes, particulièrement novatrice car limitée à la première génération de cellules modifiées génétiquement *in situ* apparaît très prometteuse. Elle ouvre la voie à toute une nouvelle série d'expérimentations sur les transferts de gènes et cela quel que soit le mécanisme de transfert considéré même si les travaux réalisés ici avec un plasmide, ciblent principalement la conjugaison. Pourraient ainsi être identifiées taxonomiquement ces cellules modifiées génétiquement et du fait du caractère quantitatif de l'outil, établie la fréquence de transfert réel du flux de gène chez les procaryotes pour chacune des espèces concernées et ce, sous toute la panoplie de conditions environnementales qu'autoriseraient des expérimentations en microcosmes. L'identification des transconjugants conduirait à élargir nos connaissances sur le spectre d'hôtes des plasmides étudiés, celle des transformants sur celui des bactéries naturellement compétentes et, en fonction des paramètres étudiés, de leur fréquence de réalisation sous différentes conditions environnementales biotiques ou abiotiques. Des applications sont également possibles avec l'étude de la transduction, mécanisme très important notamment du fait d'un nombre de particules phagiques dans l'environnement 10 fois supérieur à celui des cellules bactériennes²⁶². Les processus de transfert électrique utilisés dans nos expérimentations étant également considérés comme potentiellement impliqués dans des phénomènes de transfert dans l'environnement²⁶³⁻²⁶⁵ pourraient aussi être concernés.

Bien qu'encore en cours de développement cette nouvelle approche montre déjà des résultats prometteurs. Quelques expériences complémentaires en dévoileront le véritable potentiel avant une application sur des échantillons environnementaux pour aborder l'aspect conceptuel et fondamental à l'origine de ce développement méthodologique.

CONCLUSIONS GENERALES

Les bactéries sont les organismes les plus abondants de la planète. Leur fabuleuse diversité génétique et fonctionnelle acquise au cours de plus de 4 milliards d'années d'évolution est absolument considérable et fait d'elles des organismes au fondement de la biosphère terrestre¹⁷. Parfois uniques et propres à ce monde invisible, les activités bactériennes s'inscrivent dans un nombre important de cycles écologiques et biogéochimiques^{18,19}. A l'intérieur de cette diversité gît également un potentiel incommensurable de fonctions utiles à l'homme, pour sa santé (nouveaux médicaments), celle de son environnement (traitement des pollutions chimiques des sols, bioremédiation), de son alimentation (amélioration de la croissance des plantes, protection contre les pathogènes)⁵⁹. L'homme vit en permanence avec les bactéries avec lesquelles il entretient une relation la plupart du temps bénéfique même si c'est le caractère pathogène d'une toute petite minorité d'entre elles qui est le plus souvent perçu par le grand public^{20-23,25-29}.

Paradoxalement et en dépit de leur importance, ces organismes sont encore très méconnus. Si on considère leur nombre, leur étonnante diversité et la présence minoritaire de nombreux taxons difficilement accessibles²²², l'exploration des communautés bactériennes est en effet encore loin d'être exhaustive. Pourtant, la caractérisation de ces formes de vie faciliterait non seulement notre compréhension de la diversité génétique, physiologique et écologique des communautés tout en apportant nombre de connaissances pour le développement de nouveaux composés ou procédés biotechnologiques, pharmaceutiques et autres applications industrielles^{266,267}. La première difficulté à laquelle a été confrontée la microbiologie est celle de la taille des organismes considérés. L'invisibilité à l'œil nu des bactéries empêche toute caractérisation visuelle comme cela peut être fait pour la grande majorité des animaux et des végétaux nécessitant alors le développement de stratégies alternatives pour pouvoir les étudier. La première de ces stratégies a consisté à favoriser le développement sur milieux de culture de colonies visibles à l'œil nu suite à la multiplication d'une cellule bactérienne. Grâce à ces approches culturelles, la microbiologie a pris, depuis l'époque Pasteurienne son essor, abordant la physiologie, la génétique, l'écologie de ces organismes et permettant leur exploitation industrielle. C'est grâce à ces approches dites culturelles qu'une première caractérisation du monde bactérien a pu être réalisée après que des échantillons prélevés dans différents environnements aient été étalés sur des milieux de culture pour permettre le développement de colonies exploitables.

Toutefois et malgré tous les efforts entrepris dans ce domaine, la culture *in vitro* est incapable d'établir seule une description exhaustive des bactéries. Plus de 99 % d'entre elles demeurent encore récalcitrantes à la culture *in vitro* et l'étude des colonies n'aboutit qu'à la description/caractérisation d'une très faible partie de la diversité bactérienne existante, sous-estimant fortement le niveau de diversité au sein du monde bactérien³⁸.

C'est avec le développement conjoint des approches de métagénomique et de séquençage haut débit, qui permettent en théorie d'accéder directement à l'ADN de toutes les bactéries d'un échantillon (le métagénome) et à l'exploiter analytiquement que la microbiologie environnementale a fait un bond en avant considérable^{42,42}. En faisant de l'ADN l'objet d'étude de la bactérie, tout un pan de la diversité bactérienne a pu être dévoilé, mettant en exergue un nombre incroyable de nouvelles espèces bactériennes classées dans des phyla eux-mêmes totalement inconnus et riches de fonctions novatrices potentiellement très utiles à l'homme, pour sa santé, celle des végétaux, animaux et même son environnement et pour nombre d'autres activités industrielles. Toutefois, si la métagénomique censée contourner les biais culturels en s'intéressant à l'ADN extrait de l'environnement est souvent présentée comme universelle, elle n'en demeure pas moins elle aussi contrainte du faite de limitations techniques et conceptuelles inhérentes à la complexité et l'hétérogénéité des environnements, aux biais d'extraction de l'ADN, de clonage, de PCR et de séquençage⁵⁸. Certains taxons bactériens sont très récalcitrants aux traitements de lyse cellulaire²⁶⁸. D'autres, ne comptant qu'un faible nombre de représentants ne seront que difficilement accessibles et donc pris en compte²²². Finalement, littéralement noyés au sein d'une extrême diversité, chacun des génomes composant un métagénome verra son décryptage et en particulier la réorganisation complète de chacun de ses réplicons comme une mission encore impossible avec les technologies actuelles de séquençage et de bioinformatique. C'est donc un bilan, non d'échec mais de nécessité d'un recours à des approches complémentaires, qu'il convient de tirer des progrès pourtant fantastiques que vient de vivre en moins de deux décennies la microbiologie environnementale.

Il ne fait donc plus aucun doute aujourd'hui que l'amélioration des connaissances en microbiologie et en particulier une plus forte exhaustivité de l'inventoriage taxonomique et fonctionnel bactérien ne peut résulter de la seule application de la métagénomique et passera par la combinaison avec d'autres approches innovantes et celles traditionnelles de la culture *in vitro*. C'est ainsi que se justifie l'initiation de ce travail de doctorat visant à la construction d'un outil novateur de tri de cellules de bactéries permettant de récupérer des populations ou des cellules sur des critères taxonomiques ou fonctionnels.

Reposant sur la complémentarité des deux approches (culture *in vitro*, métagénomique) le tri cellulaire en combine certains des avantages, le premier étant d'avoir pour cible, *a priori*, l'ensemble des bactéries présentes dans un échantillon environnemental. Basé sur la sélection spécifique (taxonomique et/ou fonctionnelle) et l'isolement direct des cellules bactériennes ciblées à partir d'un échantillon environnemental complexe, il réduit la complexité qui caractérise un métagénome et en limite l'exploitation analytique. Mais le tri cellulaire fait largement appel à chacune de ces deux approches soit en proposant la mise en culture des cellules isolées pour aborder leur étude par des techniques conventionnelles si ces bactéries peuvent se développer *in vitro* soit en analysant leur ADN par une approche tirée de la métagénomique dans le cas des bactéries non cultivables. Pourra être ainsi individuellement

étudiée, au niveau génomique au minimum, chaque population bactérienne, la reconstruction de la séquence de chacun des réplicons étant facilitée par l'absence de tout autre ADN contaminant. C'est par la multiplication de telles études ciblées que se construira à terme une image de plus en plus fidèle de la structure d'une communauté bactérienne. De ces données, des spécificités métaboliques et fonctionnelles de chacune des espèces et de leur complémentarité métabolique pourront être tirées les informations concernant le fonctionnement des écosystèmes considérés comme celles plus pratiques pouvant permettre le développement de milieux de culture appropriés pour le développement *in vitro* de populations considérées jusque-là non cultivables.

Les principales technologies de tri cellulaire reposent sur deux principes majeurs, la fluorescence et le magnétisme pour marquer des bactéries ciblées sur des critères taxonomique et/ou fonctionnels, les isoler des autres et les récupérer spécifiquement. Le système développé ici fait appel aux propriétés magnétiques afin de s'affranchir de difficultés spécifiques que présente l'approche fluorescente comme notamment l'autofluorescence même si le biais que pourrait constituer une proportion élevée de bactéries magnétotactiques n'a pas encore été évalué.

Son développement a été fortement pluri- et inter-disciplinaire, nécessitant déjà de prendre en compte les lois qui régissent le magnétisme pour parvenir à saisir l'intérêt, participer au développement et utiliser des micro-aimants. A l'échelle microscopique, les gradients de champ magnétique développés par les sources aimantés deviennent considérablement importants et permettent de ce fait l'attraction d'entités magnétisées extrêmement petites même si celles-ci sont faiblement marquées. Seuls de tels systèmes présentant un très haut niveau de sensibilité sont en mesure de permettre la capture sélective d'objets biologiques de très petite taille, avec un marquage magnétique limité et pouvant être fortement dilués au sein d'une suspension bactérienne très hétérogène possiblement contaminée par des impuretés issues de l'environnement. C'est déjà cette miniaturisation qui constitue une avancée majeure du travail présenté ici. Un travail qui reflète l'état très productif de la collaboration établie avec les chercheurs et ingénieurs de l'institut Néel et du G2Elab de Grenoble, à l'origine des micro-aimants plats permanents utilisés, qui nous ont permis la création d'un tout nouveau microsystème de tri cellulaire magnétique par leur intégration dans des canaux microfluidiques. Nous avons montré la nécessité d'un développement chimique approprié à la surface (apport d'une couche de polydiméthylsiloxane (PDMS)) pour le scellement des micro-aimants ce qui offrait l'avantage de fournir : i) une intégration parfaite des micro-aimants dans le dispositif microfluidique et ii) un contrôle parfait de la vitesse du fluide à l'intérieur des microcanaux permettant à la fois attraction ou élution suivant la vitesse du flux qui peut être modulée par l'expérimentateur. La technologie développée, proposant une liaison irréversible entre les deux surfaces en contact peut, le cas échéant, conduire à une réutilisation du film magnétique pour des expérimentations ultérieures, ce qui assure une fiabilité et répétabilité au système tout en en diminuant le coût.

Avec le développement de ce système c'était donc une barrière technologique très importante qui s'ouvrait dans l'optique d'une nouvelle approche du tri de bactéries marquées magnétiquement.

De nombreux développements techniques étaient nécessaires pour combiner au sein d'un même protocole, stratégies de marquage des cellules par hybridation moléculaire, définition des régions cibles, sélection et préparation des sondes, sélection des nanoparticules magnétiques, méthodes de marquage de l'ADN, conditions d'hybridation, méthodes de validation. Il convient de souligner que les résultats préliminaires sont à la fois concluants et prometteurs, tant en termes de spécificité que de sensibilité. La spécificité est le critère sur lequel les développements pouvaient être les moins importants étant régis par les lois d'appariement des bases des acides nucléiques. Nos perspectives seront d'optimiser la longueur des sondes afin d'ajuster au mieux le niveau de spécificité en fonction des objectifs recherchés, l'isolement de bactéries à des niveaux taxonomiques des plus bas (l'espèce) aux plus élevés (phylum). La sensibilité était par contre un facteur très important si les objectifs futurs sont d'isoler des bactéries aux effectifs fortement dilués au sein de communautés complexes. Les valeurs obtenues dans le cadre de ces travaux préliminaires sur deux populations bactériennes sont extrêmement encourageantes avec un système capable de récupérer des cellules diluées à raison de 4 pour 10000 dans une suspension. Leur taux de récupération est également satisfaisant (50 %), en comparaison notamment des systèmes concurrents. Les problèmes subsistants, d'ordre méthodologique comme l'adsorption cellulaire dans les connectiques microfluidiques devraient rapidement être solutionnés ce qui laisse augurer d'une optimisation du taux de récupération.

Une technologie de tri novatrice et particulièrement efficace semble donc devoir déboucher de ces travaux qui semblent compatibles à l'isolement de populations bactériennes d'intérêt à partir de communautés d'environnements complexes en accord avec les objectifs affichés de complémentarité avec la métagénomique.

Le marquage cellulaire tel que réalisé dans cette étude par hybridation moléculaire *in situ* profitera de la richesse des données de séquences d'ARN ribosomiques retrouvées dans les bases internationales afin de s'adapter à quasiment toutes les cibles bactériennes grâce aux sondes taxonomiques qui pourront être définies à différents niveaux. Des applications à des cibles fonctionnelles sont de plus tout à fait envisageables^{110,113} et seront d'autant plus pertinentes que les séquences continueront à s'accumuler dans les bases de données.

Les travaux présentés dans la dernière partie montrent que les propriétés du magnétisme combinées à un dispositif de tri adéquat constituent également un support pour d'autres applications possibles de cette technologie. L'étude du transfert horizontal de gènes, mécanisme clé de l'évolution et de l'adaptation bactérienne, peut bénéficier d'approches qui permettent d'isoler des cellules bactériennes venant d'acquérir *in situ* un nouvel élément

génétique. Marquer par des nanoparticules magnétiques, un élément génétique mobile comme un plasmide, pourrait être intégré dans des cellules bactériennes utilisées comme vecteurs (conjugaison) ou directement inoculer dans un échantillon environnemental (transformation) pour permettre d'apporter des informations originales sur les potentiels récepteurs (transconjugants ou transformants) de la microflore indigène, indépendamment de leur aptitude à être cultivés *in vitro*, afin de comprendre la régulation *in situ* de ces événements par les conditions biotiques ou abiotiques du milieu. Le principe de ces techniques est le même que l'isolement de cellules hybridées montré précédemment et les dispositifs sont comparables. Les résultats pourraient à terme permettre d'un peu mieux comprendre comment se réalisent ces mécanismes de transfert *in situ*, évaluer leurs fréquences et apporter des réponses à des questions sociétales majeures comme par exemple l'implication des bactéries environnementales dans la dissémination des gènes de résistance à des antibiotiques aux pathogènes de l'homme. On pourrait également soulever certaines questions sur la vitesse d'adaptation extrêmement élevée qui permet à certains germes bactériens de recombinaison différents fragments d'ADN exogènes pour façonner un gène codant une enzyme de dégradation d'un polluant xénobiotique²⁶⁹.

A la lecture du dernier chapitre on a toutefois pu constater le défi technique que constitue encore l'établissement d'un protocole applicable à un environnement complexe comme le sol pour répondre aux attentes formulées ci-dessus et il n'est pas dans l'intention de masquer les difficultés restant à surmonter pour cette étude des THG car elles sont nombreuses : problème de viabilité cellulaire suite à la toxicité potentielle des nanoparticules, de réplication des plasmides, d'expression de ses gènes, incertitude sur la possibilité de réaliser un événement de conjugaison, de recombinaison, incertitude sur la compatibilité entre taille des nanoparticules et celle des pores dans les enveloppes cellulaires et donc sur la possibilité de pénétration des éléments génétiques marqués. Toutes ces questions seront abordées à la suite d'autres travaux où la faisabilité de la méthode sera définitivement confirmée ou infirmée. Il n'en demeure pas moins que nombre d'écueils techniques sont généralement surmontables à court, moyen ou long terme.

Notre objectif était d'ouvrir une nouvelle voie d'étude en microbiologie environnementale suite à un constat d'échec des technologies existantes à proposer à elles seules une réponse satisfaisante aux défis posés. Nous avons montré que cet objectif était atteint, bien que les questions ne fussent pas toutes résolues (avec des avancées toutefois plus marquées concernant l'étude de la diversité que sur le transfert horizontal de gènes) mais que la piste ouverte méritait d'être explorée car elle nous semble prometteuse pour venir en complément de l'approche culturale et de la métagénomique pour répondre aux deux grandes questions de la biologie que sont la biodiversité et l'évolution-adaptation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brasier, M. D. *et al.* Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* **416**, 76–81 (2002).
2. Yutin, N. *et al.* Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. *Environmental microbiology* **9**, 1464–75 (2007).
3. Larose, C. *et al.* Microbial sequences retrieved from environmental samples from seasonal arctic snow and meltwater from Svalbard, Norway. *Extremophiles : life under extreme conditions* **14**, 205–12 (2010).
4. Christner, B. C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L. G. & Reeve, J. N. Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. *Environmental microbiology* **3**, 570–7 (2001).
5. Mondino, L. J., Asao, M. & Madigan, M. T. Cold-active halophilic bacteria from the ice-sealed Lake Vida, Antarctica. *Archives of microbiology* **191**, 785–90 (2009).
6. De Groot, A. *et al.* *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**, 2441–6 (2005).
7. Vollú, R. E., Blank, A. F., Seldin, L. & Coelho, M. R. R. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (vetiver), an essential oil producer plant. *Plant and Soil* **356**, 101–111 (2011).
8. Guardabassi, L., Schwarz, S. & Lloyd, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **54**, 321–32 (2004).
9. Gordon James, a., Austin, C. J., Cox, D. S., Taylor, D. & Calvert, R. Microbiological and Biochemical Origins of Human Axillary Odour. *FEMS Microbiology Ecology*, Early View (2012).
10. Lozupone, C. a, Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–30 (2012).
11. Kartsen Pedersen Microbial life in deep granitic rock. *FEMS microbiology reviews* **20**, 399–414 (1997).
12. He, Z. *et al.* Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. *Extremophiles : life under extreme conditions* **11**, 305–14 (2007).

13. Fredrickson, J. K. *et al.* Geomicrobiology of High-Level Nuclear Waste-Contaminated Vadose Sediments at the Hanford Site , Washington State Geomicrobiology of High-Level Nuclear Waste-Contaminated Vadose Sediments at the Hanford Site , Washington State. *Applied and environmental microbiology* **70**, 4230–4241 (2004).
14. Li, L., Kato, C. & Horikoshi, K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation* **8**, 659–677 (1999).
15. Moyer, C. L., Dobbs, F. C. & Karl, D. M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and environmental microbiology* **60**, 871–9 (1994).
16. Pachiadaki, M. G., Kallionaki, A., Dählmann, A., De Lange, G. J. & Kormas, K. A. Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microbial ecology* **62**, 655–68 (2011).
17. Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Perspective Prokaryotes : The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 6578–6583 (1998).
18. Castenholz, R. W., Ph, D., Kane, M. D., Pace, N. R. & Salyers, A. A. *The Microbial World : Foundation of the biosphere.* (1997).
19. Falkowski, P. G., Fenchel, T. & Delong, E. F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 1034–9 (2008).
20. Atkinson, C., Frankenfeld, C. L. & Lampe, J. W. Gut Bacterial Metabolism of the Soy Relevance to Human Health. *Experimental biology and medicine* **230**, 155–170 (2008).
21. G.Lamberet, B. Aberger, J. L. B. Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis . II . Comparison of coryneform bacteria , Micrococcaceae and some lactic acid bacteria starters. *Applied microbiology and biotechnology* **48**, 393–397 (1997).
22. Fleet, G. H. Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and environmental microbiology* **48**, 1034–1038 (1984).
23. Babuchowski, A., Laniewska-moroz, L. & Warminska-radyko, I. Original article Propionibacteria in fermented vegetables. *Lait* **79**, 113–124 (1999).
24. Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology* **64**, 763–81 (2004).

25. Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. a & Domínguez-Espinosa, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in biotechnology* **22**, 477–85 (2004).
26. Tamehiro, N. *et al.* Innovative Approach for Improvement of an Antibiotic-Overproducing Industrial Strain of *Streptomyces albus* Innovative Approach for Improvement of an Antibiotic-Overproducing Industrial Strain of *Streptomyces albus*. *Applied and environmental microbiology* **69**, 6412–6417 (2003).
27. Frank, B. H. Production , and Safety of Biosynthetic Human Insulin. *Diabetes Care* **16**, 133–142 (1993).
28. Lee, S. Y., Kim, H. U., Park, J. H., Park, J. M. & Kim, T. Y. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug discovery today* **14**, 78–88 (2009).
29. Swartz, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology* **12**, 195–201 (2001).
30. Gerardi, M. H. *Wastewater Bacteria*. (John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006).
31. Jarvis, S. C., Stockdale, E. A., Shepherd, M. A. & Powlson, D. S. Nitrogen Mineralization in Temperate Agricultural Soils : Measurement Processes and Measurement. *Advances in Agronomy* **57**, 187–235 (1996).
32. Green, M. *et al.* Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-86. *American journal of public health* **80**, 848–852 (1990).
33. Rahman, K. S. M., Banat, I. M., Thahira, J., Thayumanavan, T. & Lakshmanaperumalsamy, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource technology* **81**, 25–32 (2002).
34. Denamur, E. & Matic, I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Molecular microbiology* **60**, 820–827 (2006).
35. Sun, S., Ke, R., Hughes, D., Nilsson, M. & Andersson, D. I. Genome-wide detection of spontaneous chromosomal rearrangements in bacteria. *PloS one* **7**, 426-439 (2012).
36. Paul, J. H. Microbial gene transfer: an ecological perspective. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **1**, 45–50 (1999).
37. Hirsch, P. R., Mauchline, T. H. & Clark, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 878–887 (2010).

38. Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**, 143–169 (1995).
39. Alain, K. & Querellou, J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles : life under extreme conditions* **13**, 583–594 (2009).
40. Nichols, D. *et al.* Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow in vitro. *Applied and environmental microbiology* **74**, 4889–4897 (2008).
41. Burmølle, M., Johnsen, K., Abu Al-Soud, W., Hansen, L. H. & Sørensen, S. J. The presence of embedded bacterial pure cultures in agar plates stimulate the culturability of soil bacteria. *Journal of microbiological methods* **79**, 166–173 (2009).
42. Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D. & Handelsman, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual review of genetics* **38**, 525–552 (2004).
43. Handelsman, J. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *microbiology and molecular biology review* **68**, 669–685 (2004).
44. Delmont, T. O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P. & Vogel, T. M. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *Journal of microbiological methods* **86**, 397–400 (2011).
45. Schneegurt, M. a, Dore, S. Y. & Kulpa, C. F. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Current issues in molecular biology* **5**, 1–8 (2003).
46. Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. & Stahl, D. a Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual review of microbiology* **40**, 337–365 (1986).
47. Janda, J. M. & Abbott, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology* **45**, 2761–2764 (2007).
48. Schatz, M. C. *et al.* Integrated microbial survey analysis of prokaryotic communities for the PhyloChip microarray. *Applied and environmental microbiology* **76**, 5636–5638 (2010).
49. Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H. & Tiedje, J. M. Nitrite Reductase Genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities *Applied and environmental microbiology* **66**, 2096-2104 (2000).
50. Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. & Eck, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current opinion in biotechnology* **13**, 572–7 (2002).

51. Rondon, M. R. *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and environmental microbiology* **66**, 2541–2547 (2000).
52. Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S. & Daniel, R. Construction and Screening of Metagenomic Libraries Derived from Enrichment Cultures□: Generation of a Gene Bank for Genes Conferring Alcohol Oxidoreductase Activity on Escherichia coli Construction and Screening of Metagenomic Libraries Derived from Enri. *Applied and environmental microbiology* **69**, 1408–1416 (2003).
53. Seow, K. *et al.* A study of iterative type II polyketide synthases , using bacterial genes cloned from soil DNA□: a means to access and use genes from uncultured microorganisms . A Study of Iterative Type II Polyketide Synthases , Using Bacterial Genes Cloned from Soil DN. (1997).
54. Fraser, C. M., Eisen, J. a & Salzberg, S. L. Microbial genome sequencing. *Nature* **406**, 799–803 (2000).
55. Markowitz, V. M. *et al.* An experimental metagenome data management and analysis system. *Bioinformatics (Oxford, England)* **22**, 359–367 (2006).
56. Raes, J., Foerstner, K. U. & Bork, P. Get the most out of your metagenome: computational analysis of environmental sequence data. *Current opinion in microbiology* **10**, 490–8 (2007).
57. Tyson, G. W. *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**, 37–43 (2004).
58. Luo, C., Tsementzi, D., Kyrpides, N. C. & Konstantinidis, K. T. Individual genome assembly from complex community short-read metagenomic datasets. *The ISME journal* **6**, 898–901 (2012).
59. Timothy M. Vogel, Pascal Simonet, Janet K. Jansson, Penny R. Hirsch, James M. Tiedje, Jan Dirk van Elsas, Mark J. Bailey, R. N. & L. P. TerraGenome□: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature reviews. Microbiology* **7**, (2009).
60. Voget, S. *et al.* Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. *Applied and environmental microbiology* **69**, 6235–6242 (2003).
61. Allen, H. K., Moe, L. a, Rodbumrer, J., Gaarder, A. & Handelsman, J. Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *The ISME journal* **3**, 243–51 (2009).
62. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).

63. Culligan, E. P., Sleator, R. D., Marchesi, J. R. & Hill, C. Functional metagenomics reveals novel salt tolerance loci from the human gut microbiome. *The ISME journal* **6**, 1916–1925 (2012).
64. Cox-Foster, D. L. *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 283–287 (2007).
65. Warnecke, F. *et al.* Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **450**, 560–565 (2007).
66. Venter, J. C. *et al.* Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66–74 (2004).
67. Eisen, J. a Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS biology* **5**, 82-88 (2007).
68. Mocali, S. & Benedetti, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in microbiology* **161**, 497–505 (2010).
69. Wallner, G., Fuchs, B., Spring, S., Beisker, W. & Amann, R. Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Applied and environmental microbiology* **63**, 4223–4231 (1997).
70. Petrosino, J. F. *et al.* Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical and chemistry* **55**, 856–866 (2010).
71. Abbai, N. S., Govender, A., Shaik, R. & Pillay, B. Pyrosequence analysis of unamplified and whole genome amplified DNA from hydrocarbon-contaminated groundwater. *Molecular biotechnology* **50**, 39–48 (2012).
72. Amann, R. I. *et al.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology* **56**, 1919–25 (1990).
73. Podar, M. *et al.* Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Applied and environmental microbiology* **73**, 3205–3214 (2007).
74. Giovannoni, S. J., Delong, E. F., Schmidt, T. M. & Pace, N. R. phylogenetic analysis of marine picoplankton . Tangential Flow Filtration and Preliminary Phylogenetic Analysis of Marine Picoplankton. *Applied and environmental microbiology* **56**, 2572–2575 (1990).
75. Lange, J. L., Thorne, P. S. & Lynch, N. Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria. *Applied and environmental microbiology* **63**, 1557–63 (1997).

76. Griffin, D. W. *et al.* Observations on the use of membrane filtration and liquid impingement to collect airborne microorganisms in various atmospheric environments. *Aerobiologia* **27**, 25–35 (2010).
77. Taylor, P. & Mainelis, G. Collection of Airborne Microorganisms by Electrostatic Precipitation Collection. *Aerosol Science and Technology* **30**, 127–144 (1999).
78. Hardie, J. M. & Whiley, R. a Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. *Society for Applied Bacteriology symposium series* **26**, 1–11 (1997).
79. Raeder, R., Otten, R. a, Chamberlin, L. & Boyle, M. D. Functional and serological analysis of type II immunoglobulin G-binding proteins expressed by pathogenic group A streptococci. *Journal of clinical microbiology* **30**, 3074–3081 (1992).
80. McClelland, R. G. & Pinder, A. C. Detection of Salmonella typhimurium in dairy products with flow cytometry and monoclonal. *Applied and environmental microbiology* **60**, 4255–4262 (1994).
81. Chun-Hsing Liao, Yu-Tsung Huang, Chih-Cheng Lai, Cheng-Yu Chang, Fang-Yeh Chu, Meng- Shiuan Hsu, Hsin-Sui Hsu, and P.-R. H. Klebsiella pneumoniae bacteremia and capsular serotypes, Taiwan. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1434–1438 (1998).
82. Gu, W. P. *et al.* Comparison of lipopolysaccharide and protein immunogens from pathogenic Yersinia enterocolitica bio-serotype 1B/O:8 and 2/O:9 using SDS-PAGE. *Biomedical and environmental sciences*: BES **25**, 282–90 (2012).
83. Jin, M. *et al.* A rapid subtractive immunization method to prepare discriminatory monoclonal antibodies for food E. coli O157:H7 contamination. *PloS one* **7**, 313-352 (2012).
84. Coons, A. H., Creech, H. J. & Jones, R. N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group . *Experimental biology and medicine* **47**, 200–202 (1941).
85. Albert H. Coons , Hugh J. Creech, R. N. J. and E. B. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *the journal of immunology* **45**, 159–170 (1942).
86. P. N. HOBSON AKD S. O. MANN Some Studies on the Identification of Rumen Bacteria with Fluorescent Antibodies. *Journal of general microbiology* **16**, 463–471 (1957).
87. Veal, D. a, Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. & Attfield, P. V Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of immunological methods* **243**, 191–210 (2000).

88. Levitt, D. & King, M. Methanol fixation permits flow cytometric analysis of immunofluorescent stained intracellular antigens. *Journal of immunological methods* **96**, 233–237 (1987).
89. Mansfield, L. P. & Forsythe, S. J. The detection of Salmonella using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure. *Letters in applied microbiology* **31**, 279–283 (2000).
90. Tu, S.-I., Reed, S., Gehring, A., He, Y. & Paoli, G. Capture of Escherichia coli O157:H7 Using Immunomagnetic Beads of Different Size and Antibody Conjugating Chemistry. *Sensors (Basel, Switzerland)* **9**, 717–730 (2009).
91. Catgerine W. Donnelly and Gregory J. Baigent. Method for Flow Cytometric Detection of Listeria monocytogenes in Milk. *A Applied and environmental microbiology* **52**, 689–695 (1986).
92. Best, L. M., Bezanson, G. S. & Malatjalian, D. A. Serological detection of Helicobacter pylori by a flow microsphere immunofluorescence Assay. *Journal of clinical microbiology* **30**, 2311–2317 (1992).
93. Cherry, W. B. *et al.* Detection of Legionnaires disease bacteria by direct immunofluorescent staining. *Journal of clinical microbiology* **8**, 329–338 (1978).
94. Williams, J. E. *et al.* A monoclonal antibody for the specific diagnosis of plague. *Bulletin of the World Health Organization* **66**, 77–82 (1988).
95. Ward, B. B. & Carlucci, a F. Marine ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: serological diversity determined by immunofluorescence in culture and in the environment. *Applied and environmental microbiology* **50**, 194–201 (1985).
96. Waters, F., Christensen, B., Torsvik, T. & Lien, T. Immunomagnetically Captured Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria from North Sea Oil Field Waters. *Applied and environmental microbiology* **58**, 1244–1248 (1992).
97. Toth, I. K. *et al.* Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in Erwinia carotovora subspp. atroseptica. *Journal of applied microbiology* **87**, 770–81 (1999).
98. Orellana, M. V. & Perry, M. J. An immunoprobe to measure Rubisco concentrations and maximal photosynthetic rates of individual phytoplankton cells. *Limnology and Oceanography* **37**, 478–490 (1992).
99. Hargis, J. W. & Husain, S. S. Detection of beta-lactamase in Haemophilus influenzae by immunofluorescence. *Canadian journal of microbiology* **27**, 1076–1079 (1981).

100. Michael Wagner, M. H. and H. D. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 302–309 (2003).
101. Amann, R. & Fuchs, B. M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 339–48 (2008).
102. Woese, C. R. Bacterial Evolution. *Microbiological reviews* **51**, 221–271 (1987).
103. Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of bacteriology* **172**, 762–70 (1990).
104. Agnes A. Odenyo, Roderick I. Mackie, David A. Stahl and Bryan A. White. The Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: Development of probes for Ruminococcus species and evidence for bacteriocin production. *Applied and environmental microbiology* **60**, 3688–3696 (1994).
105. Amann, R. & Ludwig, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS microbiology reviews* **24**, 555–65 (2000).
106. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. & Schleifer, K. H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology (Reading, England)* **142**, 1097–1106 (1996).
107. Ludwig, W., Dorn, S., Springer, N., Kirchhof, G. & Schleifer, K. H. PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. *Applied and environmental microbiology* **60**, 3236–44 (1994).
108. Trebesius, K., Amann, R., Ludwig, W., Mühlegger, K. & Schleifer, K. H. Identification of Whole Fixed Bacterial Cells with Nonradioactive 23S rRNA-Targeted Polynucleotide Probes. *Applied and environmental microbiology* **60**, 3228–35 (1994).
109. Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. & Pace, N. R. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of bacteriology* **170**, 720–6 (1988).
110. Zwirgmaier, K., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization - RING-FISH. *Molecular Microbiology* **51**, 89–96 (2003).
111. Kawakami, S. *et al.* Detection of single-copy functional genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes. *Journal of microbiological methods* **88**, 218–23 (2012).

112. Hoshino, T. & Schramm, A. Detection of denitrification genes by in situ rolling circle amplification-fluorescence in situ hybridization to link metabolic potential with identity inside bacterial cells. *Environmental microbiology* **12**, 2508–17 (2010).
113. Pratscher, J., Stichternoth, C., Fichtl, K., Schleifer, K.-H. & Braker, G. Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (*nirK*) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples. *Applied and environmental microbiology* **75**, 802–10 (2009).
114. Kalyuzhnaya, M. G. *et al.* Fluorescence in situ hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations. *Applied and environmental microbiology* **72**, 4293–301 (2006).
115. Bakermans, C. & Madsen, E. L. Detection in coal tar waste-contaminated groundwater of mRNA transcripts related to naphthalene dioxygenase by fluorescent in situ hybridization with tyramide signal amplification. *Journal of microbiological methods* **50**, 75–84 (2002).
116. Pernthaler, A. & Amann, R. Simultaneous Fluorescence In Situ Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. **70**, 5426–5433 (2004).
117. Moraru, C., Lam, P., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M. M. & Amann, R. GeneFISH—an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environmental microbiology* **12**, 3057–73 (2010).
118. Ludwig, W. *et al.* ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic acids research* **32**, 1363–71 (2004).
119. Yilmaz, L. S., Pamerkar, S. & Noguera, D. R. mathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for in silico evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology* **77**, 1118–22 (2011).
120. Alexander Loy, M. H. and M. W. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* **31**, 319–321 (2003).
121. Werner Manz, Rudolf Amann, Wolfgang Ludwig, Michael Wagner, K.-H. S. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria - problem and solution. *Systematic and applied microbiology* **15**, 593–600 (1992).
122. Moraru, C., Moraru, G., Fuchs, B. M. & Amann, R. Concepts and software for a rational design of polynucleotide probes. *Environmental Microbiology Reports* **3**, 69–78 (2011).
123. Alfreider *et al.* Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology* **62**, 2138–44 (1996).

124. DeLong, E., Wickham, G. & Pace, N. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360–1363 (1989).
125. Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F. O. & Glo, F. O. Culturability and In Situ Abundance of Pelagic Bacteria from the North Sea. *Applied and environmental microbiology* **66**, 3044–3051 (2000).
126. Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. & Amann, R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology* **65**, 3721–3726 (1999).
127. Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W. & Amann, R. Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* **30**, 207–210 (2001).
128. Hicks, R. E., Amann, R. I. & Stahl, D. a Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Applied and environmental microbiology* **58**, 2158–2163 (1992).
129. Fazi, S., Amalfitano, S., Pizzetti, I. & Pernthaler, J. Efficiency of fluorescence in situ hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content. *Systematic and applied microbiology* **30**, 463–470 (2007).
130. Pernthaler, A., Preston, C. M., Pernthaler, J., DeLong, E. F. & Amann, R. Comparison of Fluorescently Labeled Oligonucleotide and Polynucleotide Probes for the Detection of Pelagic Marine Bacteria and Archaea. *Applied and environmental microbiology* **68**, 661–667 (2002).
131. Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**, 136–143 (1993).
132. Gérard, E., Guyot, F., Philippot, P. & López-García, P. Fluorescence in situ hybridisation coupled to ultra small immunogold detection to identify prokaryotic cells using transmission and scanning electron microscopy. *Journal of microbiological methods* **63**, 20–28 (2005).
133. Ioannou, D. *et al.* Quantum dots as new-generation fluorochromes for FISH: an appraisal. *Chromosome research*: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology **17**, 519–530 (2009).
134. Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and environmental microbiology* **68**, 3094–3101 (2002).

135. Amann, R. I., Zarda, B., Stahl, D. a & Schleifer, K. H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology* **58**, 3007–3011 (1992).
136. DeLong, E. F., Taylor, L. T., Marsh, T. L. & Preston, C. M. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology* **65**, 5554–5563 (1999).
137. Wagner, M. *et al.* In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS microbiology letters* **160**, 159–168 (1998).
138. Stoffels, M., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Environmental microbiology* **1**, 259–271 (1999).
139. Zwirgmaier, K., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. Improved fluorescence in situ hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. *Systematic and applied microbiology* **26**, 327–337 (2003).
140. Pernthaler, A. *et al.* Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7052–7057 (2008).
141. Stuurman, N. *et al.* Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Molecular plant-microbe interactions* □: *MPMI* **13**, 1163–1169 (2000).
142. Andersen, J. B. *et al.* gfp -Based N -Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Applied and environmental microbiology* **67**, 575–85 (2001).
143. Njoloma, J. P., Oota, M., Saeki, Y. & Akao, S. Detection of gfp expression from gfp-labelled bacteria spot inoculated onto sugarcane tissues. **4**, 1372–1377 (2005).
144. Valdivia, R. H., Hromockyj, a E., Monack, D., Ramakrishnan, L. & Falkow, S. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* **173**, 47–52 (1996).
145. Babic, A., Lindner, A. B., Vulic, M., Stewart, E. J. & Radman, M. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science (New York, N.Y.)* **319**, 1533–6 (2008).
146. Sørensen, S. J., Sørensen, A. H., Hansen, L. H., Oregaard, G. & Veal, D. Direct Detection and Quantification of Horizontal Gene Transfer by Using Flow Cytometry and gfp as a Reporter Gene. *Current Microbiology* **47**, 129–133 (2003).

147. Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* **72**, 211–222 (2006).
148. Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C. & Boulanger, C. M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **64**, 109–130 (2012).
149. Kalisky, T. & Quake, S. R. Single-cell genomics. *Nature methods* **8**, 311–314 (2011).
150. Aurell, H. *et al.* Rapid Detection and Enumeration of *Legionella pneumophila* in Hot Water Systems by Solid-Phase Cytometry. *Applied and environmental microbiology* **70**, 1651–1657 (2004).
151. Mota, C. R., So, M. J. & De los Reyes, F. L. Identification of nitrite-reducing bacteria using sequential mRNA fluorescence in situ hybridization and fluorescence-assisted cell sorting. *Microbial ecology* **64**, 256–267 (2012).
152. Kalyuzhnaya, M. G. *et al.* Fluorescence in situ hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations. *Applied and environmental microbiology* **72**, 4293–4301 (2006).
153. Miyauchi, R., Oki, K., Aoi, Y. & Tsuneda, S. Diversity of nitrite reductase genes in “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*”-dominated cultures enriched by flow-cytometric sorting. *Applied and environmental microbiology* **73**, 5331–5337 (2007).
154. Wong, M.-T., Tan, F. M., Ng, W. J. & Liu, W.-T. Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 3741–3748 (2004).
155. Weber, S., Stubner, S. & Conrad, R. Bacterial Populations Colonizing and Degrading Rice Straw in Anoxic Paddy Soil. *Applied and environmental microbiology* **67**, 1318–1327 (2001).
156. Christensen, H., Hansen, M. & Sørensen, J. Counting and Size Classification of Active Soil Bacteria by Fluorescence In Situ Hybridization with an rRNA Oligonucleotide Probe. *Applied and environmental microbiology* **65**, 1753–1761 (1999).
157. Hahn, D., Amann, R. I., Ludwig, W., Akkermans, a D. & Schleifer, K. H. Detection of micro-organisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *Journal of general microbiology* **138**, 879–887 (1992).
158. Schenck, J. Safety of strong, static magnetic fields. *Journal of Magnetic Resonance* **2586**, 2–19 (2000).

159. Kauffmann P, Ith A, O'Brien D, Gaude V, Boué F, Combe S, Bruckert F, Schaack B, Dempsey NM, Haguét V, R. G. Diamagnetically trapped arrays of living cells above. *Lab on a chip* **11**, 3153–3161 (2011).
160. Frenea-Robin, M. *et al.* Contactless diamagnetic trapping of living cells onto a micromagnet array. *Conference proceedings* □: *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, **2008**, 3360–3 (2008).
161. Takayasu, M., Kelland, D. R. & Minervini, J. V. Continuous magnetic separation of blood components from whole blood. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity* **10**, 927–930 (2000).
162. N.T.K. Thanh. *Book reviews. Journal of orthodontics* **39**, pp.584 (2012).
163. Brayner, R. *et al.* Intracellular biosynthesis of superparamagnetic 2-lines ferri-hydrate nanoparticles using *Euglena gracilis* microalgae. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **93**, 20–3 (2012).
164. Roh, Y. *et al.* Microbial synthesis and the characterization of metal-substituted magnetites. *Solid State Communications* **118**, 529–534 (2001).
165. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. & Radbruch, a High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231–238 (1990).
166. Olsvik, O. *et al.* Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical microbiology reviews* **7**, 43–54 (1994).
167. Fiorini, G. S. & Chiu, D. T. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *BioTechniques* **38**, 429–446 (2005).
168. Fu, a Y., Spence, C., Scherer, A., Arnold, F. H. & Quake, S. R. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nature biotechnology* **17**, 1109–11 (1999).
169. Xuan, X. & Li, D. Focused electrophoretic motion and selected electrokinetic dispensing of particles and cells in cross-microchannels. *Electrophoresis* **26**, 3552–3560 (2005).
170. Holmes, D., Morgan, H. & Green, N. G. High throughput particle analysis: combining dielectrophoretic particle focussing with confocal optical detection. *Biosensors & bioelectronics* **21**, 1621–1630 (2006).
171. Lin, H.-C. L. C.-H. & Fu, H.-H. H. • L.-M. Microflow cytometer incorporating sequential micro-weir structure for three-dimensional focusing.pdf. *Microfluidics and Nanofluidics* **11**, 469–478 (2011).
172. Manuscript, A. Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry. *Lab on a chip* **7**, 1114–1120 (2012).

173. Yi, C. *et al.* Optical and electrochemical detection techniques for cell-based microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**, 1259–1268 (2006).
174. Chen, H.-T. & Wang, Y.-N. Fluorescence detection in a micro flow cytometer without on-chip fibers. *Microfluidics and Nanofluidics* **5**, 689–694 (2008).
175. Ateya, D. a *et al.* The good, the bad, and the tiny: a review of microflow cytometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* **391**, 1485–1498 (2008).
176. Huh, D., Gu, W., Kamotani, Y., Grotberg, J. B. & Takayama, S. Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles. *Physiological measurement* **26**, 73–98 (2005).
177. Grujic, K., Hellesø, O., Hole, J. & Wilkinson, J. Sorting of polystyrene microspheres using a Y-branched optical waveguide. *Optics express* **13**, 1–7 (2005).
178. Wang, Han-Taw Chen & Yao-Nan. Optical microflow cytometer for particle counting, sizing and fluorescence detection. *Microfluidics and Nanofluidics* **6**, 529–537 (2009)
179. Integrating advanced functionality in a microfabricated high- throughput fluorescent-activated cell sorter. 209-333 (2003).
180. Fu, A. Y., Chou, H.-P., Spence, C., Arnold, F. H. & Quake, S. R. An Integrated Microfabricated Cell Sorter. *Analytical Chemistry* **74**, 2451–2457 (2002).
181. Christensen, H., Hansen, M. & Sorensen, J. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Applied and environmental microbiology* **65**, 1753–61 (1999).
182. Ferrari, B. C., Oregaard, G. & Sørensen, S. J. Recovery of GFP-labeled bacteria for culturing and molecular analysis after cell sorting using a benchtop flow cytometer. *Microbial ecology* **48**, 239–45 (2004).
183. Cao, Q., Han, X. & Li, L. Numerical analysis of magnetic nanoparticle transport in microfluidic systems under the influence of permanent magnets. *Journal of Physics D: Applied Physics* **45**, 465001 (2012).
184. J.Fiering, C.W. Yung, A.J. Mueller, M. Varghese, K. M. I. and D. . I. Continuous high-throughput magnetic separation of pathogens from blood. *Twelfth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* 796–798 (2008).
185. Ramadan, Q., Poenar, D. P. & Yu, C. Customized trapping of magnetic particles. *Microfluidics and Nanofluidics* **6**, 53–62 (2008).
186. Smistrup, K., Tang, P. T., Hansen, O. & Hansen, M. F. Microelectromagnet for magnetic manipulation in lab-on-a-chip systems. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **300**, 418–426 (2006).

187. Lee, H., Purdon, A. M., Chu, V. & Westervelt, R. M. Controlled Assembly of Magnetic Nanoparticles from Magnetotactic Bacteria Using Microelectromagnets Arrays. *Nano Letters* **4**, 995–998 (2004).
188. Pamme, N. Magnetism and microfluidics. *Lab on a chip* **6**, 24–38 (2006).
189. Deng, T., Prentiss, M. & Whitesides, G. M. Fabrication of magnetic microfiltration systems using soft lithography. *Applied Physics Letters* **80**, 461 (2002).
190. Kauffmann, P. Lévitación diamagnétique sur micro-aimants : Application à la microfluidique digitale et à la biologie. 1–257 (2009). at <<http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00455369/>>
191. Dumas-Bouchiat, F. *et al.* Thermomagnetically patterned micromagnets. *Applied Physics Letters* **96**, 102511 (2010).
192. Kustov, M. *et al.* Magnetic characterization of micropatterned Nd–Fe–B hard magnetic films using scanning Hall probe microscopy. *Journal of Applied Physics* **108**, (2010).
193. Pamme, N. & Manz, A. On-chip free-flow magnetophoresis: continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates. *Analytical chemistry* **76**, 7250–6 (2004).
194. Inglis, D. W., Riehn, R., Austin, R. H. & Sturm, J. C. Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation. *Applied Physics Letters* **85**, 5093 (2004).
195. Adams, J. D., Kim, U. & Soh, H. T. Multitarget magnetic activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18165–70 (2008).
196. Saliba, A.-E. *et al.* Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14524–9 (2010).
197. Safarík, I. & Safaríková, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **722**, 33–53 (1999).
198. Urwyler, S., Finsel, I., Ragaz, C. & Hilbi, H. Isolation of Legionella-containing vacuoles by immuno-magnetic separation. *Current protocols in cell biology* **Chapter 3**, 1–14 (2010).
199. Dai, D., Holder, D., Raskin, L. & Xi, C. Separation of the bacterial species, *Escherichia coli*, from mixed-species microbial communities for transcriptome analysis. *BMC microbiology* **11**, 1–8 (2011).
200. Ribaut, C. *et al.* Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species. *Malaria journal* **7**, 1–5 (2008).

201. Grodzinski, P., Yang, J., Liu, R. H. & Ward, M. D. A Modular Microfluidic System for Cell Pre-concentration and Genetic Sample Preparation. *Biomedical microdevices* **5**, 303–310 (2003).
202. Lee, S. J. & Lee, S. Y. Micro total analysis system (micro-TAS) in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* **64**, 289–99 (2004).
203. Inokuchi, H., Suzuki, Y. & Kasagi, N. Development of micro immuno-magnetic cell sorting system with lamination mixer and magnetic separator. *Report* (2001)
204. Lidstrom, M. E. & Meldrum, D. R. Life-on-a-chip. *Nature reviews. Microbiology* **1**, 158–164 (2003).
205. Zanini, L. F. Autonomous Bio-Mag-MEMS based on permanent micro-magnets. (2013). (thèse soutenue le 18 fevrier 2013, Université de Grenoble).
206. Zanini, L. F. *et al.* Micromagnet structures for magnetic positioning and alignment. *Journal of Applied Physics* **111**, 07B312 (2012).
207. Dimitrov, D. S. & Angelova, M. I. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **19**, 323–336 (1988).
208. M. Angelova, D. S. D. A mechanism of liposome electroformation. *Progress in Colloid & Polymer Science* **76**, 1988 (1988).
209. Stephan, K. *et al.* Fast prototyping using a dry film photoresist: microfabrication of soft-lithography masters for microfluidic structures. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **17**, 69–74 (2007).
210. Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. & Whitesides, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical chemistry* **70**, 4974–84 (1998).
211. Vézy, C., Haddour, N., Dempsey, N. M., Dumas-Bouchiat, F. & Frénéa-Robin, M. Simple method for reversible bonding of a polydimethylsiloxane microchannel to a variety of substrates. *Micro & Nano Letters* **6**, 871 (2011).
212. Zanini, L. F., Dempsey, N. M., Givord, D., Reyne, G. & Dumas-Bouchiat, F. Autonomous micro-magnet based systems for highly efficient magnetic separation. *Applied Physics Letters* **99**, 232504 (2011).
213. Hu, X. *et al.* Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15757–61 (2005).
214. Pamme, N. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab on a chip* **7**, 1644–1659 (2007).

215. Höpfl, P., Ludwig, W., Schleifer, K. H. & Larsen, N. The 23S ribosomal RNA higher-order structure of *Pseudomonas cepacia* and other prokaryotes. *European journal of biochemistry / FEBS* **185**, 355–64 (1989).
216. Müller, M. & Hildebrandt, a Nucleotide sequences of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* and *B.avium*, and their implications for phylogenetic analysis. *Nucleic acids research* **21**, 3320 (1993).
217. Roller, C., Wagner, M., Amann, R. & Ludwig, W. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23s rRNA- targeted oligonucleotides. *Microbial* **140**, 2849–2858 (1994).
218. Yu, Y., Ying, P. Q. & Jin, G. Competitive Adsorption between Bovine Serum Albumin and Collagen Observed by Atomic Force Microscope. *Chinese Chemical Letters* **15**, 1465–1468 (2004).
219. Pu Chen, Xiaojun Feng, Wei Du, B.-F. L. Microfluidic chips for cell sorting. *Frontiers in Bioscience* **13**, 2464–2483 (2008).
220. Ishoey, T., Woyke, T., Stepanauskas, R., Novotny, M. & Lasken, R. S. Genomic sequencing of single microbial cells from environmental samples. *Current opinion in microbiology* **11**, 198–204 (2008).
221. Selimkhanov, J., Hasty, J. & Tsimring, L. S. Recent advances in single-cell studies of gene regulation. *Current opinion in biotechnology* **23**, 34–40 (2012).
222. Reid, A., Buckley, M. & Mcfall-, M. *The Rare Biosphere*. (2009).
223. Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **3**, 711–721 (2005).
224. Brown, J. R. Ancient horizontal gene transfer. *Nature reviews. Genetics* **4**, 121–32 (2003).
225. De la Cruz, F. & Davies, J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in microbiology* **8**, 128–133 (2000).
226. Top, E. M. & Springael, D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 262–269 (2003).
227. Barlow, M. What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. *Methods in molecular biology* **532**, 397–411 (2009).
228. Van der Auwera, G. a *et al.* Plasmids captured in *C. metallidurans* CH34: defining the PromA family of broad-host-range plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek* **96**, 193–204 (2009).

229. Bennett, P. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology* **153**, 347–357 (2008).
230. Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M. & Handelsman, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology* **6**, 981–9 (2004).
231. Sobecky, P. a & Coombs, J. M. Horizontal gene transfer in metal and radionuclide contaminated soils. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **532**, 455–472 (2009).
232. Harrison, E. & Brockhurst, M. a Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends in microbiology* **20**, 262–7 (2012).
233. Lorenz, M. G. & Wackernagel, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological reviews* **58**, 563–602 (1994).
234. Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. & Beatty, J. T. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 472–82 (2012).
235. Pepper, I. L., and C. P. G. Cultural Methods. In E. A. Press (ed.), *Environmental Microbiology, Oxford*. 173–189 (2009).
236. Koonin, E. V, Makarova, K. S. & Aravind, L. Horizontal gene transfer in prokaryotes□: Quantification and classification. *Annual review of microbiology* **55**, 709–742 (2001).
237. Arends, K., Schiwon, K., Sakinc, T., Hübner, J. & Grohmann, E. Green fluorescent protein-labeled monitoring tool to quantify conjugative plasmid transfer between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Applied and environmental microbiology* **78**, 895–9 (2012).
238. Roane, T. M., I. L. Pepper, and R. M. M. Microscopic Techniques. In E. A. Press (ed.), *Environmental Microbiology, Oxford*. 157–172 (2009).
239. Gruden, C., Skerlos, S. & Adriaens, P. Flow cytometry for microbial sensing in environmental sustainability applications: current status and future prospects. *FEMS microbiology ecology* **49**, 37–49 (2004).
240. Kovach, M. E. *et al.* Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–6 (1995).
241. C er emonie, H., Boubakri, H., Mavingui, P., Simonet, P. & Vogel, T. M. Plasmid-encoded gamma-hexachlorocyclohexane degradation genes and insertion sequences in *Sphingobium francense* (ex-*Sphingomonas paucimobilis* Sp+). *FEMS microbiology letters* **257**, 243–252 (2006).
242. Thomas, J. C. *et al.* Isolation and characterization of a novel gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Journal of bacteriology* **178**, 6049–6055 (1996).

243. Doolittle, W. F. Phylogenetic Classification and the Universal Tree. *Science* **284**, 2124–2128 (1999).
244. Syvanen, M. Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Annual review of genetics* **46**, 341–58 (2012).
245. Senka DZIDIC, V. B. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance. *Acta Pharmacologica Sinica* **24**, 519–526 (2003).
246. Glatzel, M., Giger, O., Seeger, H. & Aguzzi, A. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends in Microbiology* **12**, 51–53 (2004).
247. Ophélie ZEYONS Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l' environnement. 1–330 (2008).
248. Babic, A., Lindner, A. B., Vulic, M., Stewart, E. J. & Radman, M. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science (New York, N.Y.)* **319**, 1533–6 (2008).
249. Dubnau, D. DNA uptake in bacteria. *Annual review of microbiology* **53**, 517–244 (1999).
250. Haddour, N., Chevolut, Y., Trévisan, M., Souteyrand, E. & Cloarec, J.-P. Use of magnetic field for addressing, grafting onto support and actuating permanent magnetic filaments applied to enhanced biodetection. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 8266 (2010).
251. Bagatolli, L. A. *et al.* Interaction of Biotin with Streptavidin. *The journal of biological chemistry* **272**, 1288–1294 (1997).
252. Srinivasan, C. *et al.* Labeling and intracellular tracking of functionally active plasmid DNA with semiconductor quantum dots. *Molecular therapy* □: *the journal of the American Society of Gene Therapy* **14**, 192–201 (2006).
253. Géron-Landre, B., Roulon, T. & Escudé, C. Stem-loop oligonucleotides as tools for labelling double-stranded DNA. *The FEBS journal* **272**, 5343–52 (2005).
254. Hertoghs, K. M. L. Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **31**, 5817–5830 (2003).
255. Baur, B., Hanselmann, K., Schlimme, W. & Jenni, B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Applied and environmental microbiology* **62**, 3673–8 (1996).
256. William J.Dower*, J. F. M. and C. W. R. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**, 6127–6145 (1988).

257. Society, A., Chu, G. & Hayakawa, H. High-Efficiency Transformation of Bacterial Cells by Electroporation. *Journal of bacteriology* **170**, 2796–2801 (1988).
258. Jogler, C. *et al.* Toward cloning of the magnetotactic metagenome: identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments. *Applied and environmental microbiology* **75**, 3972–9 (2009).
259. Wei Lin, Christian Jogler, Dirk Schuler, and Y. P. Metagenomic Analysis Reveals Unexpected Subgenomic Diversity of Magnetotactic Bacteria within the Phylum Nitrospirae. *Applied and environmental microbiology* **77**, 323–326 (2011).
260. Lin, W., Li, J., Schüler, D., Jogler, C. & Pan, Y. Diversity analysis of magnetotactic bacteria in Lake Miyun, northern China, by restriction fragment length polymorphism. *Systematic and applied microbiology* **32**, 342–50 (2009).
261. Demanèche, S., Brard, C., Lima, O., Binet, F. & Simonet, P. Development of a new tool to improve gene transfer frequency calculations. *Journal of microbiological methods* **86**, 255–7 (2011).
262. Stephen Mc Grath and Douwe van Sinderen *Bacteriophage*: *Genetics and Molecular Biology*. **319**, (2007).
263. Simonet, P., Vogel, T. M., I, C. B. L. & Cedex, V. Natural Electrotransformation of Lightning-Competent. *Applied and environmental microbiology* **72**, 2385–2389 (2006).
264. Cérémonie, H., Buret, F., Simonet, P. & Vogel, T. M. Isolation of Lightning-Competent Soil Bacteria. *Applied and environmental microbiology* **70**, 6342–6346 (2004).
265. Bertolla, F., Sailland, A., Auriol, P., Vogel, T. M. & Simonet, P. Laboratory-Scale Evidence for Lightning-Mediated Gene Transfer in Soil. *Applied and environmental microbiology* **67**, 3440–3444 (2001).
266. Chistoserdova, L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnology letters* **32**, 1351–9 (2010).
267. Urban, M. & Adamczak, M. Exploration of metagenomes for new enzymes useful in food biotechnology E. *Polish* **58**, 11–22 (2008).
268. Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T. M. & Simonet, P. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology* **39**, 183–190 (2003).
269. Boubakri, H., Beuf, M., Simonet, P. & Vogel, T. M. Development of metagenomic DNA shuffling for the construction of a xenobiotic gene. *Gene* **375**, 87–94 (2006).

PROTOCOLES

ANNEXES

ANNEXE I : PROTOCOLE DE FABRICATION DES MICRO-AIMANTS (INSTITUT NEEL)

Une couche de film magnétique de Néodyme-Fer-Bore (NdFeB) de 5 μm d'épaisseur a été déposée par pulvérisation cathodique sur des substrats en silicium. La couche magnétique a ensuite été recouverte d'une couche de Tantale (Ta) de 100 nm d'épaisseur. Les films magnétiques de NdFeB présentaient une coercitivité d'environ 2 T et une rémanence jusqu'à 1,3 T. Ces films magnétiques étaient initialement aimantés dans une direction. Les réseaux de micro-aimants ont été obtenus sur les films magnétiques par « thermo-magnétique patterning » (cf. chapitre II), une approche qui consiste à exploiter la dépendance de la coercitivité à la température pour renverser localement l'aimantation. Les films magnétiques ont été irradiés avec un laser à fluorure de Krypton (KrF, 248 nm) pendant 25ns. Pendant l'irradiation, des masques munis d'un motif en damier de 100 x 100 μm ont été déposés sur la surface du film. Dans le même temps, un champ magnétique externe d'aimantation opposée à la direction initiale a été appliqué, ce qui a induit le renversement de l'aimantation dans les zones chauffées par le laser.

ANNEXE II : PROTOCOLE DE SYNTHÈSE ET D'ATTRACTION DE LIPOSOMES MAGNETIQUES SUR RESEAU DE MICRO-AIMANTS.

II-1. Synthèse des liposomes

Pour nos expérimentations, deux types de liposomes ont été préparés. Les premiers n'ont pas été marqués magnétiquement lors de leur synthèse mais par une molécule de Pyrène PE «1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N - (1-pyrenesulfonyl) (sel d'ammonium) (Avanti Polar Lipids) » qui émet une fluorescence de couleur bleue. Les seconds liposomes ont été marqués magnétiquement et rendus fluorescents avec une molécule de NBD PE «1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (sel d'ammonium) (Avanti Polar Lipids) » (98:2« p / p ») qui émet une fluorescence de couleur verte.

Pour préparer les liposomes marqués au pyrène, un mélange de DOPC «1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (Sigma Aldrich)» et de Pyrène PE «1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N - (1-pyrenesulfonyl) (sel d'ammonium) (Avanti Polar Lipids) » (98:2« p / p ») a été utilisé dissout dans une solution de chloroforme : méthanol (9:1 v/v) à une concentration de 1,5 mg / ml. La solution de lipide (10 μL) a été étalée sur deux plaques de verre recouvertes d'oxyde d'indium-étain (ITO) et le solvant a été évaporé pendant 1 h sous vide. Ensuite, les deux plaques séparées par un espaceur de silicium (1 mm d'épaisseur) ont été assemblées pour former une chambre étanche. La chambre est remplie d'une solution de saccharose (50 mM) à l'aide d'une seringue pendant qu'un champ électrique (sinusoïdal ;

0,4 V crête-à-crête à 20 Hz) a été appliqué entre les deux surfaces d'ITO en utilisant un générateur de fonctions arbitraires (Agilent 33250A). La tension a été progressivement augmentée, passant de 0,4 V à 1,3 V en 1 h et maintenue constante pendant 2 h. La fréquence a finalement été réduite à 4 Hz avec une tension égale à 0,4 V pour détacher les vésicules de la plaque de verre.

Les liposomes marqués magnétiquement ont été préparés selon le mode opératoire décrit ci-dessus, en utilisant un mélange de DOPC et de NBD PE «1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (sel d'ammonium) (Avanti Polar Lipids) » (98:2« p / p ») dissout dans un mélange chloroforme-méthanol (rapport volumique 9:1) à une concentration de 1,5 mg / ml. Les liposomes pouvant encapsuler des nanoparticules magnétiques au cours de l'électroformation, la chambre étanche a été remplie avec une solution de saccharose (50 mM) contenant des nanoparticules magnétiques (100 nm, Ademtech) à une concentration de 20 mg/ml. Au cours du processus d'électroformation, les liposomes ont encapsulé les nanoparticules.

II-2. *Attraction*

Pour étudier l'interaction des liposomes avec la surface magnétique, un mélange de liposomes marqués et non marqués magnétiquement (1:1) a été placé sur un réseau de micro-aimants (100x100 µm). Les observations ont été conduites avec un microscope à épifluorescence (Carl Zeiss AxioImager / AxioCam HSM caméra) pour observer, à la surface de la couche magnétique, la fluorescence des marqueurs NBD (vert) et de Pyrène (bleu) qui correspondent respectivement aux liposomes marqués magnétiquement et non marqués.

ANNEXE III : PROTOCOLE D'INTERNALISATION DE NANOPARTICULES MAGNETIQUES DANS DES BACTERIES PAR ELECTROPORATION

Des cellules d'*E.coli* DH5α ont été rendues électrocompétentes d'après le mode opératoire suivant : une colonie isolée fraîchement développée a été inoculée dans du milieu LB et incubée 1 nuit à 37 °C sous agitation de 150 rpm. Cette pré-culture a ensuite été diluée au 1/100ème dans le milieu LB pour être incubée à 37°C sous agitation de 150 rpm jusqu'à obtention d'une densité optique (DO) à 600 nm de 0.8. A partir de cette étape, les cellules bactériennes ont été maintenues dans de la glace. La culture bactérienne a été centrifugée à 4000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire lavé dans du glycérol 10 % pré-refroidi à 4°C. Les étapes de centrifugation / lavage ont été effectuées successivement 4 fois, avec un volume de glycérol 10 % froid de 1, ½ et 1/5ème du volume initial de la culture bactérienne. Les cellules ont été reprises dans un volume final de glycérol 10 % correspondant à 1/100ème du volume initial.

Pour l'électroporation, 5 μ l de nanoparticules (microbeads streptavidin Miltenyi Biotech) ont été mélangés à 50 μ l de cellules d'*E. Coli* DH5 α électrocompétentes dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm d'espacement puis soumis à un choc électrique (2.5 kV / cm 200 Ω et 25 μ F) dans un électroporateur (Gene Pulser II; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 250 μ l de milieu SOC (2 % de tryptone, 0,5 % extrait de levure, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, glucose 20 mM) et incubées 30 min à 37 °C.

ANNEXE IV : PROTOCOLE D'INTEGRATION D'UN RESEAU DE MICRO-AIMANTS DANS UN CANAL MICROFLUIDIQUE

IV-1. Fabrication des microcanaux

Des masques portant la géométrie des microcanaux (serpentins) ont été imprimés sur des films transparents à l'aide d'une imprimante 3600 dpi (Xyrius). Une couche épaisse (50 μ m) de résine sèche photosensible (LAMINAR™ E92200 dry film photopolymer, « film bleu ») a été laminée manuellement sur un substrat de verre avant d'être exposée à la lumière ultraviolette à travers chaque masque (enceinte d'insolation KLOE UV-KUB, longueur d'onde 365 nm). Les masters en film bleu employés pour le moulage du PDMS ont été obtenus par le développement du film photosensible avec une solution de Na₂CO₃ à une concentration de 0,85 % (m/m), chauffée à 35°C.

Une solution de PDMS (Sylgard 184) a été mélangée à un durcisseur (NEYCO) au ratio de 10:1 (m/m). Après dégazage sous vide, le mélange a été versé sur le master en film bleu avant séchage dans un four à 100°C pendant 2 heures. Après démoulage du PDMS, deux orifices ont été réalisés à chaque extrémité des micro-canaux.

IV-2. Revêtement du réseau de micro-aimants par une fine couche de PDMS

Le mélange de PDMS décrit ci-dessus a été dilué avec de l'heptane (Sigma-Aldrich) pour obtenir une concentration finale PDMS/heptane de 5 % (m/m)). Chacune des solutions a été étalée par centrifugation sur la surface d'un réseau de micro-aimants à 6000 rpm pendant 90s. Les échantillons ont ensuite été placés à l'étuve à 100°C pendant quelques heures pour permettre l'évaporation du solvant et le durcissement du PDMS. L'épaisseur de la couche obtenue a été mesurée à l'aide d'un profilomètre Dektak 3030.

IV-3. Scellement du microcanal sur le réseau de micro-aimants recouvert de PDMS

Le microcanal en PDMS et le réseau de micro-aimants recouvert de PDMS ont été scellés ensemble après avoir exposé les deux faces à un traitement par plasma d'air pendant 3 minutes (Expanded Cleaner Plasma, Plasma Harrick).

ANNEXE V : REGLAGE DU FLUX POUR LES EXPERIENCES DE TRI

Lors des expériences de tri, le dispositif microfluidique a été relié à un contrôleur d'écoulement (Fluigent MFCS-4C) équipé d'un logiciel permettant d'ajuster la pression (MAESFLO software).